München. 1960

Methoden zur Isolierung von Geschwulstzellen aus dem Blut

von

HELMUT MAD

AUS DER I. FRAUENKLINIK UND HEBAMMENSCHULE DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN (DIREKTOR: PROF. DR. MED. W. BICKENBACH)

METHODEN ZUR ISOLIERUNG VON GESCHWULSTZELLEN AUS DEM BLUT

INAUGURALDISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
IN DER GESAMTEN MEDIZIN
VERFASST UND
EINER HOHEN FAKULTÄT DER
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
ZU MÜNCHEN
VORGELEGT VON

HELMUT MAD
AUS NÜRNBERG

IM JAHRE 1960

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München.

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Bickenbach

Dekan: Prof. Dr. Dr. H. Eyer

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.60

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

Mein Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. W. Bickenbach, dem Direktor der I. Frauenklinik und Hebammenschule der Universität München, für die Überlassung des Themas, Herrn Dr. med. H.-J. Soost, dem Leiter des Cytologischen Laboratoriums der Klinik, für stetige Förderung und erfahrenen, wohlwollenden Rat, den Patienten für Bereitwilligkeit und Geduld.

München
1.11.59 Helmut Mad

MEINEN ELTERN

IN DANKBARKEIT

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554014_0048

Methoden zur Isolierung von Geschwulstzellen aus dem Blut.

I. Geschichtliches über Funde von Geschwulstzellen im Blut.

II. Voraussetzungen des Findens von Geschwulstzellen im Blut.

A. Allgemeines über bösartige Geschwülste.

1. Kennzeichen bösartigen Wachstums.

2. Ausbreitungswege bösartiger Geschwülste.

B. Die Ausbreitung bösartiger Geschwülste auf dem Blutweg.

1. Der Einbruch ins Gefäß.

2. Der Transport der Krebszellen im Blutstrom.

3. Das Schicksal der abgeschwemmten Zellen.

4. Metastasenhäufigkeit und - Lokalisation.

III. Auffindung der Geschwulstzellen im Blut.

A. Schwierigkeiten und Möglichkeiten der Isolierung.

B. Material der unternommenen Versuche.

1. Material der Originalversuche.

2. Material der Modellversuche.

C. Angewandte Methoden.

1. Abnahme des Blutes und Transport zur Untersuchungsstelle.

2. Methode nach Sandberg.
3. Methode nach Roberts.
4. Methode mit Hilfe von Hämolyse durch Essigsäure.
5. Methode mit Hilfe von Hämolyse durch Saponin.
6. Methode mit Hilfe der Filtration.
7. Teilweise angewandte und kombinierte Methoden.
8. Allgemeines zur Technik.
9. Identifikation der Geschwulstzellen.
10. Cytochemische Fragen.

D. Ergebnisse der Versuche im Hinblick auf das Vorkommen von Geschwulstzellen.

E. Diskussion der Ergebnisse im Hinblick auf das Vorkommen von Geschwulstzellen.

F. Erfahrungen mit den Methoden.
1. Erfahrungen mit der Sedimentierungsmethode.
2. Erfahrungen mit der Zellscheidungsmethode.
3. Erfahrungen mit den Hämolysemethoden.
4. Erfahrungen mit dem Hilfsmittel der Filtration.

G. Vergleich der Methoden im Hinblick auf die Brauchbarkeit.

IV. Zusammenfassung.

V. Tabellen und Aufnahmen.

VI. Literaturverzeichnis.

I. GESCHICHTLICHES ÜBER FUNDE VON GESCHWULSTZELLEN IM BLUT.

Im Jahre 1869 findet Ashworth im Blut eines Patienten atypische Zellen, die in Größe und Gestalt den Zellen aus den multiplen Hauttumoren des Patienten verblüffend ähnlich sind.

1880 berichtet Ehrlich über einen von Grawitz secierten Fall von Fibrosarkom. Im Verlauf seines Exkurses über Sarkomentstehung aus einer Anämie trägt er vor, daß die Mehrzahl der weißen Blutkörper aus voluminösen Elementen mit großen, plumpen, ovoiden, runden oder bohnenförmigen Kernen bestanden habe. Eine nähere Beschreibung der Zellen erfolgt nicht.

Im Jahre 1890 berichten Israel und Leyden das Sektionsergebnis einer an multipler Sarkomatose verstorbenen Patientin und erwähnen, daß ".. die Leukocythen zum großen Theil großkernige Elemente waren, Zellen mit großen, bläschenförmigen Kernen ..."

Im Jahre 1906 veröffentlichen zwei Autoren unabhängig voneinander ähnliche Beobachtungen: Aschoff findet im Blut eines Patienten, der an einem ausgedehnten Plasmocytom litt, für die Geschwulst typische Zellen im Blut. Schleip berichtet über das weiße Blutbild eines Patienten, mit ubiquitären Knochenmetastasen, das im

Laufe der Krankheit bis zu 54 % atypische Zellen zeigt. Schleip beschreibt diese Zellen als 15 - 20 µ große Elemente mit basophilem Protoplasma und chromatinarmem Kern, der, wenn von kleinerer Gestalt, rund oder tief gekerbt, wenn von größerer, bohnenförmig, gelappt oder S-förmig sei.

Erst im Jahre 1913 wird wieder eine ähnliche Beobachtung veröffentlicht. Im Blut eines Sterbenden findet Ward viele Zellen in einer Größe von 20 - 30 µ die offensichtlich identisch mit kleineren Riesenzellen im Knochenmark gewesen seien, welches keine makroskopisch sichtbaren Metastasen enthalten habe.

Marcus berichtet im Jahre 1917 über einen Patienten mit einem Bronchialcarcinom, das in den rechten Vorhof eingebrochen war. 1 Prozent der weißen Blutkörper seien große Zellen gewesen, die teilweise Vakuolisation, deren Kerne eine, in der Pappenheimfärbung sehr unregelmäßige, Chromatinverteilung aufgewiesen hätten. Eine Zelle hätte er als typische Siegelringzelle ansprechen müssen.

Der erste, der systematisch nach Geschwulstzellen im Blut forscht, ist Quensel. Im Jahre 1921 veröffentlicht er das Ergebnis seiner Untersuchungen aus dem Blut des rechten Vorhofs von 50 an bösartigen Tumoren verstorbenen Patienten.

Er hämolysiert das Blut mittels H_2O und kann in 6 Fällen den im direkten Vergleichspräparat gewonnenen Zellen genau entsprechende im Blut nachweisen. Es han-

delt sich um 4 Magencarcinome, 1 Lungencarcinom und 1 Hypernephrom.

Im letzteren Fall war die dem Primärtumor eigentümliche Zellverfettung auch in den im Leichenblut aufgefundenen Zellen zu finden. Quensel verweist zur Identifikation der Geschwulstzellen auf die ungewöhnliche Größe, die stärkere Anfärbbarkeit, die Vergrößerung der Nukleolen.

Pool und Dunlop veröffentlichen im Jahre 1934 das Ergebnis ihrer Untersuchungen an 40 Patienten mit fortgeschrittenen Carcinomen. Sie konnten nach Hämolysierung von 5 ml Oxalatblut in 17 Fällen große, runde Zellen mit runden oder leicht gebogenen, stark angefärbten Kernen finden. Nur in einem Fall der 40 normalen Vergleichspräparate wurde eine solche Zelle gefunden.

1952 berichtet Undritz in den " Hämatologischen Tafeln Sandoz ", daß im ersten Tropfen Blut aus dem vorher nicht berührten Ohrläppchen von Patienten mit metastasierenden Tumoren große, peroxydasenegative, blutfremde Elemente, wahrscheinlich Tumorzellen, gefunden werden können.

Drei Jahre später erscheint eine Arbeit von Engell über Krebszellen im Blut. Von zahlreichen Patienten mit bösartigen Geschwülsten hat der Verfasser aus vom Tumor abführenden Venen vor und nach der Mobilisation desselben, außerdem aus der Cubitalvene Blut entnommen, hämolysiert und den Rückstand auf blutfremde

Zellen untersucht. Der Autor vergleicht mit den so gewonnenen Präparaten die jüngeren Teile des Tumors im histologischen Schnitt. In zahlreichen Fällen gelinge es ihm, Tumorzellen im Blut nachzuweisen, für die er an Charakteristiken folgendes angibt: Unregelmäßige Lage, Gestalt, Chromatinzeichnung, tiefe Färbung der Kerne, gegebenenfalls deren Vervielfachung, dazu Vergrößerung oder Vervielfachung der Nukleolen.

Beim Differentiationsgrad II nach Broders kann er in 17 von 49 Fällen Tumorzellen im Blut finden, beim Grad III in 40 von 51 Fällen, beim Grad IV endlich in jedem der 6 Fälle. Im Blut aus der regionalen Vene wurden weit häufiger Tumorzellen gefunden, als im Blut aus der Armvene.

Ebenfalls im Jahre 1955 berichten Fisher und Turnbull über ihre cytologischen Untersuchungen in der Durchströmungsflüssigkeit entfernter Tumoren sowie im Mesenterialvenenblut, das während der Operation von Rectum oder Coloncarcinomen abgenommen wurde. Sie erwähnen besonders das häufige Vorkommen großer, nackter Kerne. In 32 % der Fälle erhalten sie ein positives Resultat.

Im Juli des Jahres 1957 veröffentlichen Sandberg und Moore ihre Untersuchungen, die sie nach Beschleunigung der Blutkörperchensenkung durch Fibrinogenzusatz vorgenommen hatten.

Im Blut aus regionalen Venen konnten sie in 40 % der Fälle Tumorzellen nachweisen, aus der Armvene

in 42 % der Fälle. Dabei ist zu berücksichtigen, daß es sich bei den Patienten, deren Blut aus der Armvene entnommen wurde, in der Mehrzahl um solche mit inoperablen Geschwülsten handelt.

In einer Veröffentlichung vom Oktober des selben Jahres können Moore, Sandberg und Schubarg bereits über 288 untersuchte Fälle Bericht erstatten. Im Armvenenblut 179 operabler und inoperabler Patienten sehen sie in 93 Fällen Tumorzellen, im Blut der regionären Venen in 60 Fällen von 109 operablen Tumoren.

Die Autoren betonen besonders, daß sie keinen postoperativen Anstieg der Zellzahl finden konnten. Sie behaupten, die Zahl der gefundenen Zellen stehe in keinem vergleichbaren Verhältnis zum klinischen Zustand der Patienten.

Roberts, Watne, McGrath, McGrew und Cole veröffentlichen im März des Jahres 1958 eine eingehende Studie über das Vorkommen von Krebszellen im Blut. Sie bedienen sich zur Isolierung der gesuchten Zellen der durch Fibrinogen beschleunigten Absetzung der Erythrocyten und der Zentrifugierung über einer Albuminlösung, deren spezifisches Gewicht zwischen dem der Tumorzellen und dem der Leukocyten liegen sollte. Neben der Blutentnahme aus der Armvene bedienten sie sich der Aspiration aus regionären Venen mit oder ohne Zwischenschaltung eines Blutgefäßkatheters.

Bei 12 von 72 Patienten mit " heilbaren " Geschwülsten und bei 9 von 28 Patienten mit " unheilbarer " Geschwulstbildung konnten Krebszellen im Blut gefun-

den werden. Im Blut von 14 Kontrollpersonen mit benignen Erkrankungen wurden keine ähnlichen Zellen entdeckt. Die Blutproben aus den regionalen Venen waren sehr viel ergiebiger als die Entnahmen aus der Armvene. Bei 60 Patienten wurde das Verhalten der Zellzahl während der Operation überprüft. In 12 Fällen konnten Tumorzellen gefunden, in 6 Fällen ein zum Teil erheblicher Anstieg während der Präparation verzeichnet werden. Minuten nach der Opteration schon wurden jeweils keine Zellen mehr gefunden.

Im November des Jahres 1958 veröffentlichen Sandberg, Moore, Crosswhite und Schubarg eine Untersuchung über Tumorzellen im Mark (- dies war zuvor schon durch Gormsen im Jahre 1942 unternommen worden -) und im Blut. Sie unterscheiden zwischen einzeln liegenden Zellen die sie vorsichtig als " atypisch " bezeichnen, und Zellen, die in Klumpen liegen und ohne Ein - schränkung als Tumorzellen apostrophiert werden. Bei vergleichenden Untersuchungen des Markpunktats und Blutes von 305 Patienten mit bösartigen Geschwülsten finden sie im Mark in 7.2 % der Fälle Krebszellen, in 12.5 % atypische Zellen, im Blut in 8.8 % der Fälle Krebszellen und in 8.5 % atypische Zellen. (Ein signifikanter Unterschied in der Fündigkeit der beiden Proben scheint also nicht zu bestehen.)

Ebenfalls im Jahre 1958 erscheint eine Arbeit von Whang über Untersuchungen im Mark und im Blut. Die Blutuntersuchungen wurden in Anlehnung an die Methode

von Engell ausgeführt. Im Blut aus der Armvene von 26 Patienten (davon 21 inoperabel) fand er keine Geschwulstzellen. Im Blut aus der Femoralarterie von 11 Patienten (davon 8 inoperabel) waren ebenfalls keine Zellen zu finden. Eine Carcinomzelle wurde in einer von 8 während der Operation aus örtlichen Venen entnommenen Blutproben gefunden. Dagegen fanden sich in 6 von 18 Venenblutproben aus Operationspräparaten Carcinomzellen, außerdem in einem von 40 Sternalpunktaten.

Im Dezember des Jahres 1958 erscheint eine Veröffentlichung von Pruitt, Hilberg und Kaiser, die nach einer im Jahre 1956 von Seal entwickelten und in Jahre 1958 von Malmgren, Pruitt, del Vecchio und Potter, sowie von Juniper und Chester erprobten Methode das Blut von 100 krebskranken und 200 anderen Patienten auf Carcinomzellen untersuchten. Jene Methode stützt sich auf Hämolyse durch Streptolysin-O mit anschliessender Filtration des verbleibenden Restes durch kleinporige Filter. In einem der 200 Kontrollversuche wurden Zellen gefunden, die als maligne angesprochen werden mußten. In 39 von 100 untersuchten Fällen konnten Tumorzellen in Blut festgestellt werden. 19 Fälle aus jenen 100, die unbehandelt waren, zeigten zu 53 % Carcinomzellen.

Im Jahre 1959 erscheint eine Arbeit von Seal, der Blut über einer Silikonmischung mit einem spezifischen Gewicht von 1.075 zentrifugiert, den leichteren Rest zur Sicherheit hämolysiert und durch plane Filter

filtriert. Bei 86 Versuchen kam er 39 mal zu einem positiven Ergebnis. In 16 Fällen fand er " verdächtige " Zellen.

Im gleichen Jahr erscheint von Sandberg, Moore und Schubarg eine Abhandlung über cytologische Differentialdiagnose atypischer Zellen aus dem Blut.

II. VORAUSSETZUNGEN DES FINDENS VON GESCHWULSTZELLEN IM BLUT.

Allgemeines über bösartige Geschwülste.

Kennzeichen bösartigen Wachstums.

Die Voraussetzungen dieser Zellfunde im Blut müssen überprüft werden.

Die morphologischen Kennzeichen des malignen Wachstums und der malignen Zelle dürfen als bekannt gelten. Eine Eigenschaft der bösartigen Zelle soll erwähnt werden, die von hoher Bedeutung für den Charakter der bösartigen Geschwulst ist: ihre amöboide Beweglichkeit, auf die schon Virchow im Jahre 1863 anläßlich der Untersuchung eines Enchondroms hingewiesen hat. Wanderungsgeschwindigkeiten bis zu 6.2 µ /Min. werden berichtet. (Coman,1953.) Dieses Aufgeben des Zellverbandes scheint durch den gegenüber gleichartigem gesunden oder regenerierendem Gewebe um ca. 40 % erniedrigten Calciumgehalt des Geschwulstgewebes begünstigt oder gar verursacht zu sein(de Long, Coman und Seidman, 1950). Eine Untersuchung über serologische Faktoren der Zellaneinanderlagerung führte zu keinem deutlichen Ergebnis (Spiegel, 1955).

Dieser Fähigkeit der malignen Zelle, wie sie sonst im Körper noch Leukocyten eigentümlich ist, verdankt die bösartige Geschwulst die Möglichkeit des für sie charakteristischen invasiven Wachstums.

Ausbreitungswege bösartiger Geschwülste.

Jenes invasive Wachsen in der Richtung des geringsten mechanischen Widerstandes führt 1.) zur lokalen Ausbreitung, 2.) zur Abschilferung an den Oberflächen der Körperhöhlen und zur Ausbreitung in epithelialen Räumen, 3.) beim Einbruch in Lymphgefäße durch Abschwemmung der Zellen zu Metastasen in den von ihnen berührten Lymphknoten, 4.) beim Einbruch in die Blutbahn (- zuerst beschrieben von Thiersch im Jahre 1865 -) zum Mitgerissenwerden der Krebszellen im Blutstrom mit der Möglichkeit zur Verbreitung im ganzen Körper.
Dieser Vorgang der hämatogenen Metastasierung wird uns für unsere Untersuchung am meisten interessieren.

Die Ausbreitung bösartiger Geschwülste auf dem Blutweg.

Der Einbruch ins Gefäß.

Es erfolgt weit öfter der Einbruch in venöse Gefäße und Capillaren als in arterielle Gefäße (Willis, 1948). Das Einwachsen in Blutgefäße erfolgt häufig. Brown und Warren zum Beispiel konnten beim Rectumcarcinom in 61 % der Fälle einen Einbruch in die Blutgefäße feststellen. Ins Gefäßlumen gelangte Krebszellen können bei erhaltengebliebener Strömung mitgerissen werden.

Der Transport der Krebszelle im Blutstrom.

Es wirft sich die Frage nach der Verteilungsmöglichkeit dieser nun im Blut befindlichen Zellen auf. Drei Capillarsysteme stellen sich jenen Zellen zum Auffangen entgegen: Die Lebercapillaren beim Antransport über die vena portae, die Lungencapillaren nach dem Transport durch die venae cavae, die Capillare des großen Kreislaufes nach Ausspülung durch die Aorta. Alle drei Gebiete können von der einzelnen Zelle wie auch von Zellhaufen passiert werden. Prinzmetal, Ornitz, Simkin und Bergmann fanden, daß beim lebenden Kaninchen injizierte Glasperlen in einer Größe bis zu 180 /u die Leber, bis zu 290 /u die Lunge passieren können. Zeidman und Buss konnten im Jahre 1952 über positive Ergebnisse einer Tierversuchsreihe berichten, in deren Verlauf während der Injektion von Carcinomzellen in die Ohrvene Blut aus der Aorta entnommen und einem zweiten Tier injiziert wurde.
Da derartige Anastomosen auch aus der Peripherie des großen Kreislaufs allgemein bekannt sind, scheint hinreichend erwiesen, daß jene Zellen jedes Organ des Körpers auf dem Blutwege erreichen können.
Versuche zur Tumorübertragung durch Blutübertragung wurden öfters unternommen. Im Jahre 1929 berichtet Blumenthal über positive Resultate,

die bei Tumorvenenblut höher gelegen hätten als bei Herzblut. Unabhängig davon veröffentlicht Lipschütz im gleichen Jahre ähnliche Ergebnisse. 1931 teilt Fränkel einen einmaligen Erfolg beim Überimpfen von Herzblut der Maus mit. Im Jahre 1941 berichtet Ostenfeld über Angehen des Tumors in einigen Fällen bei Überimpfung von Blut tumortragender Mäuse. Beim Menschen ist ein unfreiwilliger Versuch bekannt. Im Jahre 1929 veröffentlicht Mauclaire eine Mitteilung, nach der einer Patientin wegen einer Anämie Blut der Mutter übertragen wurde ohne Wissen darum, daß die Spenderin drei Jahre zuvor wegen einer bösartigen Neubildung operiert worden war. Vier Monate nach der Transfusion macht sich bei der Mutter ein Rezidiv bemerkbar, das rasch den Tod herbeiführt. Obgleich es möglich ist, daß das übertragene Blut Krebszellen enthielt, blieb die Empfängerin der Transfusion über fünf Jahre frei von bösartigen Neubildungen.

Das Schicksal der abgeschwemmten Krebszellen.

Nicht alle im Blut befindlichen Zellen führen zu einer Metastasenbildung. Jeanné zum Beispiel führt im Jahre 1925 einen Fall an, bei dem trotz massiven Einbruchs eines Bronchialcarcinomes in eine Lungenvene nur Lymphknotenmetastasen bei der Sektion nachweisbar waren, obwohl mit Sicherheit angenommen werden kann, daß eine große Anzahl von Tumorzellen

sich in der Blutbahn befand. - Wie verhalten sich diese Zellen im Blutgefäßsystem?
Die meisten Zellen aus dem Abstromgebiet der vena portae werden in der Leber, die meisten Zellen aus den venae cavae in der Lunge festgehalten. Am besten untersucht ist das Verhalten der Tumorzelle in den Blutgefäßen der Lunge. Goldmann veröffentlicht im Jahre 1897 die Ergebnisse seiner ausgedehnten Untersuchungen der Lungengefäße von Patienten, die an bösartigen Neubildungen gestorben waren. Er findet häufig Embolie von Tumorzellen, folgende Thrombosierung, Hyalinisation oder Anwachsen.
Im Jahre 1903 erscheint eine Studie von M.B. Schmidt, die sich dem gleichen Gegenstande widmet. Er stellt mit Sicherheit fest, daß sich die Fernmetastase der Lunge aus dem Blutgefäß heraus entwickelt, und berichtet wie Goldmann über das Zugrundegehen der größten Zahl der Tumorzellen unter den Zeichen der Abscheidung körnig hyaliner Thromben und der Neubildung von Bindegewebe; wobei wahrscheinlich die sich verschlechternde Ernährung der Zelle die Hauptrolle spiele. Weiter wird erwähnt, daß sich richtiggehende Schübe der Einschwemmung und manchmal das Weiterwachsen durch die Capillaren an Serienschnitten beobachten ließe (" Venenkrebs ").
So können zwei Wege angenommen werden, wie die Krebszelle die Lungencapillare zu überwinden imstande ist, einmal durch die direkte Passage, zum anderen durch erneuten Abstrom von der im venösen

Gefäß befindlichen Tumorproliferation (Willis, 1948). Nur in seltenen Fällen durchbrechen die Krebszellen die Wand des Blutgefäßes und wachsen in das Organ ein; dabei wird die Wand der Arterie am seltensten der Ort des Einbruchs (Coman, de Long und McCutcheon 1951, Baserga und Saffiotti, 1955). Diese Befunde über das Schicksal der eingeschwemmten Tumorzellen im Lungengewebe konnten ganz oder teilweise auch von Takahashi im Jahre 1915, Iwasaki, 1915, Warren und Gates, 1936, angegeben werden.

Metastasenhäufigkeit und - Lokalisation.

Eine weitere Frage, die uns im Zusammenhang mit der hämatogenen Metastasierung bewegt, ist die nach der Ursache der Häufigkeit und der Lokalisation. Zeidman, McCutcheon und Coman konnten in Tierversuchen zeigen, daß die Häufigkeit der Metastasen linear von der Zahl der angeschwemmten Zellen abhängig ist, damit in praxi von der Länge des Bestehens des Primärtumors und von der Breite des Einbruchs ins Blutgefäß, also von Lokalisation und Malignitätsgrad, welcher wiederum sich nach der Invasionsfähigkeit richtet.

Die Lokalisation der hämatogenen Metastase muß nach den vorliegenden Untersuchungen in erster Linie auf mechanische Faktoren zurückgeführt werden. Hier ist in erster Linie Zahl und Querschnitt der Capillaren von Bedeutung.

Die drei am häufigsten durch hämatogene Metastasen heimgesuchten Orte beim Menschen sind: Lunge, Leber und Wirbelsäule.

Der häufige Befall von Lunge und Leber läßt sich leicht mit der Filterung des Blutes aus den venae cavae und der vena portae erklären. Für den vorzugsweisen Befall der Wirbelsäule konnten Coman und de Long im Jahre 1951 eine ausreichende Erklärung durch Versuche an Ratten beibringen, deren Blutgefäßsystem an den hierfür wichtigen Stellen sehr große Ähnlichkeit mit dem des Menschen aufweist. - Wenn die Untersucher Tumorzellen in die Femoralvenen unter leichtem Druck auf den Bauch injizierten, fanden sie in 12 von 14 Fällen vertebrale Metastasen, während sie bei Injektion ohne Bauchdruckerhöhung nur in einem von 16 Fällen Wirbelsäulenmetastasen fanden.- Es handelt sich also hierbei gleichsam um ein " Einhusten " der Krebszellen über die Venen, die in großer Zahl die Bauchhöhle mit den Wirbelkörpern verbinden.

Außer diesen drei Hauptarten der hämatogenen Metastasierung, die alle vom venösen Blutstrom ausgehen, ist auch die Möglichkeit der Zellverschleppung im Gebiet des großen Kreislaufes auf arteriellem Wege - meist nach Passage der Lunge - möglich. Interessant ist dabei, daß Heparin - und Thorotrasteinspritzungen die Passierbarkeit der Lunge erhöhen, wie Ambrus, Ambrus, Byron, Goldberg und Harrison im Jahre 1956 bei ihren Versuchen an Mäusen, denen mit P^{32} markierte Asciteszellen eingespritzt wurden, aufzeigen konnten.

Für die Lokalisation der Metastasen im Gebiet des großen Kreislaufes muß angenommen werden, daß außer der Zahl und Größe der Capillaren noch grob mechanische Kräfte berücksichtigt werden müssen: Wenig Metastasen in die Organe mit Eigenbewegung: Muskel, Herzmuskel, Verdauungstrakt, häufiger Metastasen in Niere und Nebenniere, die nicht eigenbeweglich und gut vaskularisiert sind.

Die Feststellung von Willis, daß in der Lunge mehr zerstörte Tumorzellen zu sehen seien als in der Leber, und die Befunde von Lucké, Breedis, Woo, Berwick und Nowell aus dem Jahre 1952, die in Tierversuchen bei Einspritzung von Carcinomzellen einmal in vena portae oder arteria hepatica zum anderen in eine Ohrvene nach 12 Tagen in der Leber 5 mal größeres Wachstum feststellten als in der Lunge, können vielleicht durch die ständige Bewegung der Lunge durch die Atmung erklärt werden.

Für die Annahme, daß für das Zustandekommen einer Metastase noch besondere " Milieufaktoren " eine Rolle spielten, finden sich keine Beweise. Gedacht wurde an ähnliche Mechanismen, wie sie Weiss im Jahre 1950 gefordert hatte, oder wie sie Bierbaum und Mitarbeiter im Jahre 1951 bei Kreuztransfusionen mit Blut von Leukämiekranken gesehen haben wollen.

III. AUFFINDUNG DER GESCHWULSTZELLEN IM BLUT.

Schwierigkeiten und Möglichkeiten der Isolierung.

Die Zahl der Krebszellen im Blut, besonders im Blut der peripheren Vene ist sehr klein, wenn man sie mit den Zahlen der normalen Blutkörperchen vergleicht. Im Cubiccentimeter Blut finden sich beim Erwachsenen durchschnittlich 7 Millionen Leukocyten und 5 Milliarden Erythrocyten, während Engell bei seinen Untersuchungen im Durchschnitt erst in über dreißig Cubiccentimetern Armvenenblut von Geschwulstkranken eine Tumorzelle finden konnte. Es liegt auf der Hand, daß bei der systematischen Suche nach der Geschwulstzelle im Blut Anreicherungsmethoden angewandt werden müssen, die auf Grund des chemischen oder physikalischen Verhaltens der Zelle ihre Auffindung erleichtern. Durch einen Vergleich der Methoden, welche von den früheren Untersuchern gebraucht wurden, zu einer wirklich brauchbaren Methode zu gelangen, wird das hauptsächliche Unternehmen unserer Untersuchungen sein.

Die Eigenschaften der Geschwulstzelle, die eine Isolierung aus dem Blut zur Untersuchung begünstigen, seien kurz aufgezeigt:

1.) Das spezifische Gewicht der Tumorzelle liegt unter dem der Erythrocyten, das durchschnittliche spezifische Gewicht unter dem der Leukocyten.

2.) Die Größe der Geschwulstzelle liegt über der Größe der meisten Blutzellen.
3.) Hypotone Lösungen, die zur Hämolyse führen, beeinträchtigen die Morphologie der Tumorzelle kaum.
4.) Die Krebszelle vermag einigen Substanzen Widerstand zu leisten, die Erythrocyten und Leukocyten zum Teil oder ganz aufzulösen imstande sind.

Material der unternommenen Versuche.

Material der Originalversuche.
Wir untersuchten Blut aus der Cubitalvene von 44 Patienten mit meist fortgeschrittenen bösartigen Geschwülsten. Bei vier dieser Patienten wurde zweimal Blut entnommen. Achtmal wurde Blut von gesunden oder nicht an Carcinom oder Sarkom erkrankten Personen zum Vergleich untersucht.
Bei den Kontrollversuchen handelt es sich um fünf Blutproben vom gesunden Menschen, eine Probe von einer Patientin mit einem axillären Abszeß, eine Probe von einem Patienten mit allgemeiner Gefäßsklerose und eine Probe von einem Patienten mit chronischer Lymphadenitis.
Unter den Patienten mit durchweg fortgeschrittenen bösartigen Neubildungen befinden sich: 18 Fälle mit Collumcarcinom des Uterus, 8 Fälle mit Mammacarcinom, je 4 Fälle mit Ovarialcarcinom und Corpuscarcinom des Uterus, je 2 Fälle mit Carcinom der Vagina, malignem Hypernephrom, Bronchialcarcinom, je 1 Fall mit Prostatacarcinom, Larynxcarcinom, Uterussarkom und Melano-

sarkom. (Siehe Tabelle III) 22 der 44 Patienten wiesen klinisch Fernmetastasen auf; 11 der Patienten sind inzwischen verstorben.

Material der Modellversuche.

Zur leichteren Erprobung der angewandten Methoden wurden 32 Modellversuche unternommen. 27 mal wurden durch Abstrich mittels Watteträger oder Zerquetschen kleiner Gewebsbröckel von in der Vagina sichtbaren Tumoren Carcinomzellen in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und nach Zentrifugierung zu einigen Cubiccentimetern Blut der gleichen Patientin gegeben. Zweimal wurden Carcinomzellen aus Ascites ins Blut der Patientin gebracht. Einmal wurde der Versuch unternommen, unter Blut gemischte Zellen des Wangenepithels wieder zu isolieren.

Angewandte Methoden.

Abnahme des Blutes und Transport zur Untersuchungsstelle.

Das Blut zu unseren Versuchen wurde mittels steriler Pravaz-Spritze (10 ccm) entnommen; die Spritze enthielt meist 2 ccm Natriumcitratlösung 3.8 %, aufgezogen wurde bis zur Marke 10. In einigen Fällen benützten wir zur Gerinnungsverhinderung einige Tropfen Eleparon (Luitpold). Dies erwies sich wegen der Hypertonie des Präparates als unzweckmäßig.

Natriumcitrat schädigt in den gewöhnlichen Dosen die

Leukocyten morphologisch nicht, in physiologischer Hinsicht kaum (siehe auch: Allgöwer, 1947).
Der Transport des gut gemischten Blutes in das Laboratorium vollzog sich in Reagenzgläsern mit Gummistopfen. Normalerweise wurden die Proben sofort verarbeitet. Wartezeiten bis zu 24 Stunden bei Raumtemperatur zeigten aber keine wesentlichen Zelldestruktionen. (Siehe auch: Graham, 1933.)

Methode nach Sandberg.

Als erste Methode zur Isolierung von Geschwulstzellen auf Grund ihres spezifischen Gewichtes erprobten wir die Methode nach Sandberg und Moore (1957), die auf den Arbeiten von Fåhraeus (1921), Gray und Mitchel (1942) und Minor und Burnett (1948) basiert.

4 ccm venöses Blut und 1 ccm Natriumcitratlösung 3.8 % wurden vorsichtig mit 2 ccm Heparin-Fibrinogenlösung vermischt, welche pro Cubiccentimeter 0.5 mg Heparin und zwischen 30 und 50 mg Rinderfibrinogen (Behringwerke) enthielt.
Die Lösung wurde für je 10 ccm frisch bereitet in 50 ccm-Gläsern, die durch Gummistopfen fest verschließbar waren. Die Lösung wird am zweckmäßigsten in der Weise vollzogen, daß unter die in das Gefäß gebrachte, abgewogene Menge Fibrinogen die Heparinlösung durch seitlichen Zufluß geschichtet wird. Die Auflösung der Fibrinogenmasse erfordert einige Zeit. Erwärmung bis auf Körpertemperatur und Veränderung der Lage des Gefäßes sind zu empfehlen. Schütteln ist wegen der daraus

entstehenden Schaumbildung nicht ratsam, wenn die Lösung bald gebraucht wird. (Nach einigen Stunden ruhigen Stehens verschwindet der Schaum wieder.) Manchmal muß eine Fibrinogenflocke, die sich nach Quellung nicht auflöst, mit einem Glasstab zerquetscht werden.

Das Fibrinogen bewirkt Zusammenlagerung der Erythrocyten in Rollenform, und läßt diese demzufolge schnell absinken. Nach 15 - 20 Minuten hat sich ein nur mehr ganz schwach rot gefärbter Plasmaüberstand gebildet; manchmal ist zur Senkung des Hämatokritwertes Zugabe von 1 - 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung notwendig.

Der Plasmaüberstand wurde vorsichtig mittels einer Blutzuckerpipette, die über ein kurzes Stück Gummischlauch mit einer 10 ccm-Spritze verbunden war, abgesaugt, in ein Zentrifugenglas gebracht und bei einer Geschwindigkeit von 1000 Umdrehungen/Min. 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgenommen, verworfen, das Sediment aufgeschüttelt, tropfenweise auf Objektträger gebracht und wie ein Blutstropfen ausgestrichen. Danach erfolgte schnell die Fixierung in Äther/Alkohol (1:1) für mindestens 20 Minuten und Färbung nach Papanicolaou, Eindecken mit großem Deckglas und Durchmusterung der Präparate.
Nach dieser Methode wurden 6 Originalversuche und 10 Modellversuche angestellt.
Weitere Arbeiten nach dieser Methode erschienen von Moore, Sandberg und Schubarg (1957), Sandberg, Moore, Crosswhite und Schubarg (1958) und von Sandberg, Moore und Schubarg (1959).

Methode nach Roberts und Mitarbeiter.

Als zweite Methode zur Isolierung von Geschwulstzellen aus dem Blut auf Grund ihres spezifischen Gewichtes erprobten wir die Methode, die in ihrer Gesamtheit Roberts, Watne, McGrath, McGrew und Cole im Jahre 1958 angegeben haben, eine Methode, die sich auf die Arbeiten von Vallee, Hughes und Gibson (1947), Fawcett, Vallee und Soule (1950), Buckley, Powell und Gibson (1950) und Agranoff, Vallee und Waugh (1953) stützt.

Die Methode umfaßte zwei Arbeitsgänge. Als ersten die Eliminierung der Erythrocyten durch Zugabe einer Fibrinogenlösung, als zweiten die Zentrifugierung des so gewonnenen Plasmaüberstandes über einer Lösung von Rinderalbumin, deren spezifisches Gewicht zwischen dem der Krebszellen und dem der weißen Blutkörperchen liegen sollte.
Roberts und Mitarbeiter verwandten Präparate der Pentex-Corporation, Kankakee, Illinois. Uns standen Präparate der Behringwerke, Marburg, zur Verfügung, die sich von den ersteren im Reinheitsgrad beträchtlich unterscheiden.
Die untersuchten Blutproben wurden in der oben angeführten Weise abgenommen. Danach erfolgte Bestimmung des Hämatokritwertes.
Durch das Wissen um die genaue Zusammensetzung des Fibrinogenpräparates, das Roberts und Mitarbeiter gebraucht hatten, war es uns möglich, unsere Fibrinogenlösung genau gleich einzustellen. Wir lösten im sterilen

Glasgefäß 240 mg Rinderfibrinogen (Behringwerke) unter den oben erwähnten Vorkehrungen in einem Gemisch von 4ccm 3.8 % Natriumcitrat und 6ccm Aquadest. Diese Lösung hatte ein pH von 7.6 (Glaselektrode) und zeigte weder Hyper- noch Hypotonie. Bei Aufbewahrung im Kühlschrank waren nach 4 Tagen noch keine Veränderungen der Wirksamkeit zu vermerken.

Die Lösung von 24 mg des Präparates der Behringwerke in einem ccm, die etwa einer Konzentration von 20.4 mg Fibrinogen entsprach, anstelle einer Lösung von 14 mg/ccm, wie sie Roberts und Mitarbeiter verwandt hatten, war zum Ausgleich der höheren Verdünnnung des Blutes durch Abnahme mit Natriumcitratlösung gegenüber der Gerinnungsverhinderung durch Heparin bei Roberts und Mitarbeitern nötig. Der effektive Ausgleich geschah über die Berechnung nach der Formel von Buckley:

$$f = F\ (\ 1.00 - H_2\ )\ W_2 - 3\ (\ 1.00 - H_1\ )\ W_1$$

wobei zu setzen ist:

f = Fibrinogen in mg in der gesamten Lösung,

F = Fibrinogenkonzentration in mg/ccm,

H_1= Hämatokritwert des abgenommenen Blutes,

H_2= Hämatokritwert des gemischten Blutes,

W_1= Volumen des abgenommenen Blutes,

W_2= Volumen des gemischten Blutes,

3 = Normalmenge Fibrinogen im menschlichen Plasma in mg.

Als Bestwerte ermittelte Buckley in ausgedehnten Versuchen für

$$F = 6.0 \text{ bis } 7.0 \text{ mg/ccm},$$

für

$$C = \frac{H_2}{100 - H_2} = 0.3 \text{ bis } 0.5\ .$$

Wir wählten im Anschluß an Roberts und Mitarbeiter für $F = 6.7$ mg/ccm, für $H_2 = 27$ %.

Die Berechnung der zur möglichst vollständigen Sedimentierung der Erythrocyten notwendigen Menge Fibrinogenlösung und Kochsalzlösung erfolgte nach diesem Muster:

Abgenommen wurde eine Blutmenge von 10 ccm. Die Hämatokritbestimmung ergab 42 %.

$10.0 \cdot 0.42 = 4{,}20$

($W_1 \cdot H_1 =$ Zellvolumen.)

$4.20 : 0.27 = \underline{15.5}$

$$\left(\text{Zellvolumen} : \frac{H_2}{100 - H_2} = W_2 \right)$$

$f = 6.7 (1.00 - 0.27) 15.5 - 3 (1.00 - 0.42) 10 =$

$4.891 \cdot 15.5 - 17.4 = \underline{58.4}$ mg Fibrinogen

$$\left(\left(f = F (100 - H_2) W_2 - 3 (1.00 - H_1) W_1 \right) \right)$$

$58.4 : 20.4 = \underline{2.8}$ ccm Fibrinogenlösung

$$\left(\frac{\text{Gesamtfibrinogen in mg}}{\text{Gehalt der Fibrinogenlösung in mg/ccm}} = \text{Fibrinogenlösg.in ccm} \right.$$

10.0 (W_1

$\underline{+ \ 2.8}$ + Fibrinogenlösung in ccm)

12.8

15.5 (W_2

$\underline{- 12.8}$ - W_1 + Fibrinogenlösung in ccm)

$\underline{2.7}$ = NaCl - Lösung in ccm.

Die abgenommene Blutmenge wird im Reagenzglas, in dem es ins Laboratorium gebracht wurde, mit der errechneten Menge Fibrinogenlösung und der nötigen Menge Koch-

salzlösung versetzt. Die Lösungen wurden mit sauberer Spritze und Nadel durch den Gummistopfen aus den verschlossenen Gläsern getrennt entnommen. Es empfiehlt sich, die im Kühlschrank aufbewahrte Fibrinogenlösung sich vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmen zu lassen. Buckley und Mitarbeiter fanden die Erythrocytensedimentierung am besten zwischen 12° und 37° Celsius vor sich gehen.

Gute Durchmischung wurde durch vorsichtiges Kippen erreicht; Schütteln ist wegen der drohenden Schaumbildung zu vermeiden.

Die Erythrocyten lagern sich in Rollenform aneinander und sind nach durchschnittlich 50 Minuten endgültig absedimentiert, während zu dieser Zeit noch etwa 75 % der im gleichen Blutvolumen zu erwartenden Leukocyten im überstehenden Plasma sich befinden.

Nach 40 - 45 Minuten wurde das überstehende Plasma mit Spritze und Mikropipette abgenommen. Damit war der erste Teil des Versuches beendet, die möglichst weitgehende Eliminierung der Erythrocyten.

In zweiten Teil des Versuches sollten die in dem gewonnenen Plasma schwebenden Leukocyten und eventuellen Krebszellen, soweit es ging, getrennt werden.

Wir bereiteten eine 35 %ige Lösung von Serumalbumin vom Rind (entsalzt, " reinst ", Behringwerke) in destilliertem Wasser. Die Lösung wurde (- je 10 ccm frisch-) bereitet in einem durch Gummistopfen verschließbaren Glasgefäß durch Zulaufenlassen des Lösungsmittels zu der schon im Gefäß befindlichen Trockensubstanz. Bei

einer Temperatur von ca. 37° Celsius ist zur Vermeidung von Schaumbildung keine mechanische Irritation außer einem leichten Neigen des Gefäßes nötig. Nach 2 Stunden ist der Vorgang abgelaufen.

Die Lösung hat ein pH von 6.1 , das durch 3 mg Natriumbicarbonat pro ccm auf einen Wert von 7.4 gebracht wurde. Die Lösung war nicht hypotonisch. Reste unverbrauchter Lösung wurden einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt.

Während des Absedimentierens der Erythrocyten wurde die Albuminlösung, die ein spezifisches Gewicht von 1.090 ± 0.01 hat, mit sauberer Spritze durch den Gummistopfen hindurch entnommen und in ein 15 ccm-Zentrifugenglas gebracht. Da zur Abtrennung der Geschwulstzellen von den Leukocyten eine Lösung mit einem spezifischen Gewicht von ungefähr 1.075 am geeignetsten ist, wurde der Lösung am Rande des Gefäßes vorsichtig die zur Verdünnung notwendige Menge physiologische Kochsalzlösung zugegeben, welche nach der Formel von Agranoff errechnet worden war:

$$D = \frac{Da \cdot Va + Db \cdot Vb}{Va + Vb}$$

Wobei zu setzen ist:

D = das erwünschte spezifische Gewicht,

Da = das spezifische Gewicht der Albuminlösung,

Va = das zugegebene Volumen der Albuminlösung,

Db = das spezifische Gewicht der Kochsalzlösung,

Vb = das zuzugebende Volumen der Kochsalzlösung.

Die Vermischung geschieht am besten durch leichte, kreisende Bewegungen.

Auf diese Albuminlösung wird nun der Plasmaüberstand des ersten Versuchsteils vorsichtig aus der Mikropipette an der Gefäßwand zugegeben. Je langsamer der Zulauf, desto weniger Vermengung der Flüssigkeiten. Zur Orientierung arbeiteten wir mit spezifischen Gewichten von 1.090 bis 1.060. Der Durchschnitt lag bei 1.075.

Die übereinandergeschichteten Lösungen wurden darauf mit einer Geschwindigkeit von 1000 Umdrehungen 10 Minuten zentrifugiert, danach mit einer Geschwindigkeit von 2.700 Umdrehungen 20 - 30 Minuten lang. Der Plasmaüberstand ist schon nach dem ersten Schritt der Zentrifugierung klar. Die zweite Stufe vermehrt den Durchtritt von Leukocyten und verbliebenen Erythrocyten. Nach dem Zentrifugieren zeigt sich bei geeignetem Vorgehen zwischen Albuminlösung und zellfreiem Plasma eine schmale, scharf abgegrenzte, trübe Schicht, unter der Albuminlösung ein leicht rotes Sediment.
Der größte Teil des überstehenden Plasma wurde mit Pipette abgenommen und verworfen. Die unterste Plasmazone, die zellhaltige Zwischenschicht und der oberste Teil der Albuminlösung mittels Mikropipette und Spritze abgesaugt, in ein Zentrifugenglas gebracht und in etwa 10 ccm Kochsalzlösung, mit welcher die Abnahmevorrichtung gespült worden war, gemischt. Nach erneuter Zentrifugierung von 10 Minuten bei 1000 Umdrehungen wurde der Überstand, in dem sich für die Färbung störende Reste von Plasma und Albumin stark verdünnt hatten, verworfen, das Sediment mit wenigen verbliebenen Tropfen Flüssigkeit

aufgeschüttelt, in Mikropipette aufgezogen, tropfenweise auf Objektträger gebracht, nach Art des Blutausstreichens verteilt und noch feucht in Äther/Alkohol (1:1) mindestens 20 Minuten lang fixiert. Daran schloß sich Färbung der Ausstriche nach Papanicolaou an. In den meisten Fällen wurde das Sediment unter dem Albumin in gleicher Weise zur Untersuchung gebracht.
Um Ungenauigkeiten bei der Verdünnung zu vermeiden, gingen wir bei den letzten Versuchen dazu über, die Albuminlösungen gleich in der gewünschten Konzentration herzustellen.
Nach dieser Methode wurden von uns 11 Blutproben mit eingemischten Krebszellen und 22 Blutproben aus der Cubitalvene ohne Zusatz untersucht.

Methode mit Hilfe von Hämolyse durch Essigsäure.

Als dritte Methode zur Auffindung von Geschwulstzellen im Blut versuchten wir die Vernichtung der Erythrocyten durch Essigsäure im Anschluß an die Arbeit von Pool und Dunlop aus dem Jahre 1934.
Wir verwendeten Essigsäure in einer Konzentration von 5 % im Gegensatz zu Pool und Dunlop, die 15 %ige Essigsäure verwandt hatten, da wir die Zellveränderungen der Leukocyten bei höheren Konzentrationen doch als zu störend empfunden haben. Im Durchschnitt verwandten wir pro ccm abgenommenes Citratblut 50 ccm 5 %ige Essig - säure, die nach Abzentrifugieren des Plasma mit dem Blute gut vermischt worden waren. Nach Zentrifugierung

von 20 Minuten bei 1500 Umdrehungen saugten wir den zellfreien Überstand ab, schüttelten das massige rostbraune Sediment auf, brachten es mit Mikropipette/Spritze tropfenweise auf Objektträger und verteilten es nach Art des Blutausstriches. Danach erfolgte Fixierung der noch feuchten Präparate in Äther/Alkohol (1:1) und Färbung nach Papanicolaou.
Nach dieser Methode untersuchten wir fünfmal Blut mit eingemischten Carcinomzellen, sechsmal reines Blut.

In dreien der Modellversuche füllten wir vor dem Zentrifugieren eine kleine Menge des Gemisches in eine feine Bürette und ließen es 20 Stunden absedimentieren. Nach tropfenweisem Ablassen des Sediments erfolgte die weitere Untersuchung wie vorher beschrieben.

Methode mit Hilfe von Hämolyse durch Saponin.

Als vierte Methode zur Auffindung von Geschwulstzellen im Blut verwandten wir in Anlehnung an die umfangreiche Arbeit von Engell aus dem Jahre 1955 1 %ige Saponinlösung zur Auflösung der Erythrocyten.
Wir nahmen mit einer Spritze, in der sich 2 ccm 3.8 %ige Natriumcitratlösung befanden, 8 ccm Blut aus der Ellenbeugenvene. Nach dem Transport ins Labor in einem verschlossenen Reagenzglas brachten wir das Blut in einen leicht mit physiologischer Kochsalzlösung angefeuchteten Erlenmeyerkolben, der 200 ccm faßte, und vergrößerten mit physiologischer Kochsalzlösung das Volumen der Mischung auf 45 - 50 ccm. Dazu wurde Kochsalzlösung

benutzt, die vorher zum Spülen des zum Transport gebrauchten Reagenzglases verwandt worden war.
Nach guter Durchmischung gaben wir tropfenweise aus einer Spritze unter ständigem Schwenken des Erlenmeyerkolbens innerhalb einiger Minuten die benötigte Menge 1 %ige Saponinlösung zu (Durchschnittswert für 8 ccm Blut 1.3 ccm 1 %ige Saponinlösung), bis uns die Hämolyse fast vollständig zu sein schien.
(Es empfiehlt sich, hierbei sehr vorsichtig vorzugehen, weil bereits bei einer Zugabe von 1.5 - 1.7 ccm Saponinlösung schwerste Kernzerstörungen sichtbar waren. Die Saponinwirkung verläuft langsam.)
Die nahezu vollständig lackfarbene Lösung wurde darauf mit Mikropipette/Spritze in 4 Zentrifugengläschen (15 ccm) gefüllt und 5 Minuten lang bei 1500 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand, der keine Leukocyten, aber den größten Teil der Erythrocytenhüllen und des überschüssigen Saponins enthielt, wurde schnell abgenommen. Die Sedimente wurden in wenigen Tropfen einer Kochsalzlösung, die vorher zum Spülen des Erlenmeyerkolbens gedient hatte, wieder aufgeschüttelt, in ein Zentrifugenglas gesammelt und nochmals bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Sediment leicht aufgeschüttelt, mit Mikropipette/Spritze aufgenommen, tropfenweise auf Objektträger gebracht und wie ein Blutstropfen ausgestrichen. Die noch feuchten Präparate wurden in Äther/Alkohol (1:1) für eine Dauer von 20 Minuten fixiert und anschließend nach Papanicolaou gefärbt.

Nach dieser Methode untersuchten wir 8 Proben von Blut aus der Armvene ohne Beimengungen.

Methode mit Hilfe der Filtration.

Diese Methode verwandten wir auch in einer Kombination mit einem Hilfsmittel, das Seal im Jahre 1958 zuerst bei der Suche nach in großen Mengen Flüssig - keit suspendierten Krebszellen (Wundwaschungen) angewandt hatte, nämlich der Filtrierung durch plane Filter. Diese Anregung Seals wurde bereits von einer Arbeitsgruppe - bestehend aus Pruitt, Malmgren, del Vecchio, Potter, Hilberg und Kaiser - bei der Suche nach Krebszellen im Blut aufgenommen.
Die Blutprobe wurde nach Verdünnung durch Kochsalzlösung mit Saponin hämolysiert. Nach Zentrifugierung des Gemischs und Abnahme des Überstandes wurden die vier Sedimente mit einigen Tropfen Kochsalzlösung aufgeschüttelt und daraufhin weiter mit Kochsalzlösung versetzt. Daran schloß sich die Filtrierung durch Cellafilter " grob " der Membranfiltergesellschaft, Göttingen, in dem Filtriergerät " B 5 " der gleichen Firma bei geringem Unterdruck (bis zu 20 mm Hg) . Das Gerät war über ein Quecksilbermanometer mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden.
Die poröse Auflegeplatte des Filtriergerätes wurde mit Kochsalzlösung benetzt, das plane Cellafilter mit 55 mm Durchmesser, welches in Flüssigkeit aufbewahrt worden war, luftblasenfrei aufgelegt (Luftblasen verhindern den

Flüssigkeitsdurchtritt an den betreffenden Stellen.) und mit Aufsatz und Schraube befestigt. Der Hahn des Filtriergerätes blieb geschlossen. Nun erzeugten wir mittels Wasserstrahlpumpe den gewünschten Unterdruck, füllten das Aufsatzgerät mit dem aufgeschwemmten Sediment aus einem der vier Zentrifugengläschen. Dieses wurde noch vier - bis fünf mal mit Kochsalzlösung ausgespült und in das Aufsatzgerät entleert.
Alle gebrauchten Instrumente und Gefäße wurden ebenfalls mit ca. 400 ccm Kochsalzlösung gereinigt, ein Viertel der Spülflüssigkeit ebenfalls durch dieses Filter geschickt.
Wenn keine Flüssigkeit mehr auf dem Filter zu sehen war, - dies geschah sehr schnell -, unterbrachen wir die Filtration, nahmen Schraube und Aufsatzgefäß ab, faßten das Filter mit zwei Pinzetten und brachten es in eine Petrischale, in welche wir mit großer Vorsicht am Rande Äther/Alkohol (1:1) zufließen ließen, um die Zellen auf dem Filter zu fixieren.
Ebenso wurde mit den Sedimenten in den drei anderen Gläschen und dem Rest der Spülflüssigkeit verfahren.

Das Zufließenlassen von Fixierflüssigkeit muß möglichst vorsichtig geschehen, damit keine Zellen durch die zulaufende Flüssigkeit vom Filter abgelöst werden.

Nach einer Fixierdauer von mindestens 20 Minuten wurden die Filter an ein Gestell geklammert, das den Färbecuvetten aufgesetzt werden konnte, und nach Papanicolaou gefärbt. Die normalen Zeiten der Dehydratation und der

Durchsichtigmachung im Xylol wurden dabei etwa verdoppelt, ebenso die Wässerungsdauer nach der Hämatoxylineinwirkung.
Die Filter wurden dann luftblasenfrei auf doppelt große (77 x 52 mm), mit einigen Tropfen Eindeckmittel bestrichene Objektträger gebracht und mit sehr viel Eindeckmittel und doppelt großen Deckgläsern eingedeckt. Der langwierige Trocknungsprozeß wurde durch doppelte Raumtemperatur etwas beschleunigt.

Teilweise angewandte und kombinierte Methoden.

Bei einer Blutentnahme konnten wir nur einige Tropfen gewinnen. Wir zentrifugierten Plasma und Citrat ab und fertigten von dem verbliebenen Sediment ohne weitere Behandlung Ausstriche an.
Bei zwei Modellversuchen brachten wir Ascites mit Carcinomzellen direkt auf Albuminlösungen von bestimmten spezifischen Gewichten und versuchten so Aufschlüsse über das spezifische Gewicht dieser Geschwulstzellen zu erhalten.
Einmal trugen wir reine, krebszellhaltige Ascitesflüssigkeit und mit Blut der gleichen Patientin vermischte Ascitesflüssigkeit auf Albuminlösung vom gleichen spezifischen Gewicht auf, um das Verhalten der Krebszellen in Abhängigkeit von der Menge der Leukocyten zu prüfen.

Bei einem Modellversuch und einem Originalversuch hämolysierten wir das Blut mit Essigsäure und versuchten, das Sediment durch Zentrifugieren über einer Albuminlösung zu trennen.

Bei einem Kontrollversuch mit Blut vom Gesunden teilten wir das Blut in zwei gleiche Mengen und untersuchten diese getrennt nach der Methode in Anlehnung an Engell und der Methode nach Sandberg.
Bei einem weiteren Kontrollversuch teilten wir das Blut ebenfalls in zwei Teile und untersuchten es getrennt nach der Methode von Engell und der Methode von Roberts.

Bei einem dritten Kontrollversuch teilten wir das gewonnene Blutvolumen ebenfalls in zwei Hälften, untersuchten es nach der Methode von Engell und einer Methode zur Hämolyse, die Szilárd im Jahre 1926 angegeben hatte. Sie bestand aus der Zugabe von 15 ccm einer Mischung aus 2.5 % Essigsäure und 2 % Weinsäure (4 : 1) zu 10 ccm Blut und rascher Neutralisation durch 2 % KOH.
Bei einem Modellversuch mit eingemischten Carcinomzellen eines Ovarialcarcinoms, die aus der Ascitesflüssigkeit der Patientin gewonnen waren, teilten wir das Blutvolumen in drei Teile und untersuchten diese nach den Methoden von Engell, Roberts und Szilárd.

Allgemeines zur Technik.

Allgemein sei noch zu unserer Arbeitsweise vermerkt:
Das Blut aus der Armvene wurde möglichst langsam und mit größerer Nadel (Nr. 2) entnommen. Auch wurden Flüssigkeiten, die noch zu untersuchende Zellen enthielten, mit großer Langsamkeit in die enge Pipette mit Hilfe einer durch ein kurzes Schlauchstück verbundenen Spritze

aufgesaugt. Es hatte sich gezeigt, daß sonst zerstörte Zellen häufiger auftraten.

Dieses Instrument ist einer Pipette mit Gummiball durch die Möglichkeit der Abschätzung des aufgesaugten Volumens, die leichtere Sogregulierung, die leichtere Reinigungsmöglichkeit überlegen. Die Flexibilität des Zwischenstückes macht das Gerät sehr handlich. Die kleine Glaspipette hat vor einer Stahlkanüle den Vorzug, daß man in jener auch wenige Tropfen aufgesaugter Flüssigkeit genau sehen kann.

Um Zusammenballungen von Leukocyten zu vermeiden, schüttelten wir das betreffende Sediment zum Teil heftig. Der Erfolg war nie vollständig. den Zusatz von Streptokinase-Streptodornase wagten wir nicht, um der Zerstörung eventuell degenerierter Geschwulstzellen nicht Vorschub zu leisten. (Siehe auch die Arbeit von Johnson aus dem Jahre 1950.)

Der Gefahr des Abgeschwemmtwerdens von Zellen bei der senkrechten Einbringung der noch feuchten Ausstrichpräparate in die Fixierflüssigkeit suchten wir durch dünnes Bestreichen der Objektträger mit Serumglycerin und durch das Aufstreichen möglichst " trockener " Tropfen mit befriedigendem Erfolg Herr zu werden.

Mattierte Endstücke an unseren Objektträgern ermöglichten leichte Kennzeichnung der Präparate mit Bleistift, welche über die ganze Färbung unverändert erhalten blieb und erst nach dem Trocknen der Präparate durch aufgeklebte Schildchen aus steifem Papier ersetzt wurde.

Die Färbung erfolgte bei allen Präparaten nach Papanicolaou.

Die " Cellafilter " der Membranfiltergesellschaft in Göttingen konnten durch Verdoppelung der Entwässerungszeiten glasklar aufgehellt werden. Sie zeigten eine schwachrosa Eigenfärbung.
Die Eindeckung wurde in der normalen, oben erwähnten Weise mit Canadabalsam oder Eukitt vorgenommen.
Die Betrachtung der Präparate erfolgte auf dem Kreuztisch im Rastersystem bei Umkehr an der langen Seite zuerst mit Objektiv 10 oder 25. Verdächtige Zellen konnten mit Objektiv 40 und Objektiv 100 (Öl) betrachtet und unter Sicht des Auges bei Lupenvergrößerung (2.5) mittels eines Tintenpunktes auf dem Deckglas markiert werden. Dies scheint uns einfacher und praktischer als die von del Vecchio, Siegler und Hilberg im Jahre 1956 publizierte Methode, die sich eines an einem alten Objektiv befestigten Gummibuchstabens " O " bedient.

An Betrachtungszeit muß für ein Ausstrichpräparat bis zu einer Stunde veranschlagt werden, für einen 55 mm-Filter bis zu zwei Stunden.

Identifikation der Geschwulstzellen.

Bei der Durchmusterung der Präparate, die meistens große Mengen von Leukocyten, oft auch Erythrocyten zeigten, richteten wir unsere Aufmerksamkeit vorzüglich auf große Zellen und auf stark angefärbte Zellen.

Wiewohl bei der eigentümlichen Anisocytose der Carcinomzellen Exemplare mit einem Durchmesser nicht größer als der eines Lymphocyten, vorkommen mögen, ja auch

Zellen einer bösartigen Geschwulst eine blasse Anfärbung des Kernes zeigen können, so ist beides jedoch nicht sehr häufig. Besonders ein Zusammentreffen dieser beiden Eigenschaften in einer Krebszelle scheint überaus selten.

Große oder stark angefärbte Zellen, oder solche, die beide Charakteristiken vereinigen, konnten wir viele finden. Wir waren also gehalten, uns über die genaueren Kennzeichen der bösartigen Geschwulstzelle, wie sie in der allgemeinen Cytologie bekannt sind, zu informieren, wie auch die von früheren Untersuchern der gleichen Materie gefundenen Ergebnisse zu vergleichen.
Die hauptsächlichen cytodiagnostischen Kennzeichen der Krebszelle sind von Papanicolaou (1954) sowie von Smolka und Soost (1956), in Bruchstücken auch in den Arbeiten von MacCarty (1914), Mandlebaum (1917), Zemansky (1928), Zadek (1933), Haumeder (1933), MacCarty und Haumeder (1934), Naidu (1935), MacCarty (1936) wie folgt beschrieben: Der im Verhältnis zum Plasma zu große Kern von polymorpher Gestalt sei hyper-, eventuell hypochromatisch anfärbbar, zeige grobes, unregelmäßiges Chromatin, sei manchmal von einer verdickten Membran umgeben und enthalte selten einmal eine Vakuole. Die Kernkörperchen seien eventuell vermehrt und immer in Beziehung auf den Kern vergrößert. Besonders von MacCarty wird letzteres als einziges "unabdingliches" Kennzeichen genannt.
Keiner der bisherigen Untersucher des Blutes auf Geschwulstzellen hat davon in wesentlichen Punkten abweichende Beobachtungen mitgeteilt. Auch unsere

Ergebnisse lassen sich in jenes System einordnen. (Siehe Tabelle I.)
Nach den Erfahrungen von Undritz, Sandberg und Mitarbeitern und Roberts und Mitarbeitern sind besonders leicht folgende im Blut befindliche Zellen mit Geschwulstzellen zu verwechseln: Kerne von Megakaryocyten oder Teile davon (- erkennbar an den vielen kleinen Nukleolen -), Monocyten (- Azurgranula im Plasma -), Plasmazellen (- keine Nukleolen; besonders häufig in einem unserer Kontrollversuche mit Blut einer Wöchnerin, abgenommen 3 Tage post partum -), Lymphocyten, junge Blutzellen wie Erythroblasten und Promyelocyten, Endothelien, die beim Einstich ebenso wie Oberhautzellen mitgerissen werden. (Der Größe nach für eine Verwechslung mit Geschwulstzellen in Frage kommende Blutzellen siehe Tebelle II , deren Angaben den Hämatologischen Tafeln Sandoz entnommen sind.)
In Abstrichen und Punktaten stand uns im Cytologischen Labor der I. Universitäts-Frauenklinik München reiches Carcinomzellmaterial zur Verfügung. Wo es möglich war, wurden sowohl cytologische, als auch histologische Präparate der Patienten zum Vergleich eingesehen.

Zellen, die nicht eindeutig als Geschwulstzellen eingestuft werden konnten, wurden als negativ gedeutet.
Die gefundenen Geschwulstzellen waren in einigen Fällen aneinandergelagert. Wir halten es für übervorsichtig, nur in Gruppen liegende atypische Zellen für Geschwulstzellen zu erklären, einzeln liegende dagegen nur als " atypisch " zu führen, wie dies Sandberg, Moore und

Schubarg im Jahre 1959 ausführlich darlegten.
Zellen im Blut eines Geschwulstkranken in einer Größe über der der Monocyten, mit wenig Plasma, hyperchromatischem Kern, grobem, unregelmäßigem Chromatin und 1 - 2 großen, plumpen Nukleolen halten wir für Geschwulstzellen, auch, wenn sie einzeln liegen.

Cytochemische Fragen.

Wir überlegten uns, ob es nicht möglich wäre, die Geschwulstzelle als solche oder in ihrer Eigenschaft als Körperzelle von den Blutzellen in färberischer Hinsicht abzuheben.
Die Glykogenarmut der malignen Zelle läßt an die PAS-Färbung nach Hotchkiss denken. Jedoch zeigten Mitus, Bergna und Dameshek im Jahre 1958, daß nicht alle Lymphocyten Glykogengranula enthalten.
Von der Färbung nach Roskin (1947) ließen wir uns durch die negativen Kommentare von Gomori (1952) und Ebner (1953) abhalten. Nach Roskin sollten Kerne maligner Zellen die Fähigkeit verloren haben, aus Leukomethylenblau Methylenblau zu bilden.
Die Anfärbung der in Carcinomzellen häufiger als in normalen Zellen vorkommenden Phospholipide im Säure-Hämatein-Test ist sehr schwierig und nicht sehr deutlich.

Die Peroxydasefärbung nach Graham-Knoll schaltet einen Teil der Monocyten, die Lymphocyten und Plasmazellen nicht aus der Differentialdiagnose aus und bietet so keine wesentliche Erleichterung.

Es scheint bis heute unwahrscheinlich, daß überhaupt zwischen malignen und benignen Zellen in der Gesamtheit nicht nur quantitative, sondern auch deutliche qualitative Unterschiede in chemischer Hinsicht bestehen, die eine unterschiedliche Färbung zulassen.

So blieben uns zur Erkennung nur die morphologischen Kennzeichen der Geschwulstzelle.

Ergebnisse der Versuche im Hinblick auf das Vorkommen von Geschwulstzellen.

Nach diesen cytologischen Kriterien konnten wir im Blut von 9 aus 44 untersuchten Patienten Geschwulstzellen feststellen. Es handelte sich um Zellen mit einer Größe zwischen 20 und 30 µ, die größtenteils wenig Zellplasma besaßen. Die Kerne waren meist hyperchromatisch; ein Kern zeigte eine deutlich verdickte Kernmembran. Die Chromatinstruktur der Kerne war durchweg grob, unregelmäßig. Ein Kern wies einen vakuolenartigen Defekt in seiner Mitte auf. Die Nukleolen waren - soweit deutlich sichtbar - erheblich vergrößert. Bei vier der neun Patienten konnten wir in Gruppen liegende Carcinomzellen beobachten.
Bei acht dieser neun Patienten waren zum Zeitpunkt der Blutabnahme hämatogene Metastasen klinisch bekannt. Beim neunten Patienten bestand ein schweres örtliches Rezidiv.
Bei den neun Patienten handelt es sich um ein Collumcarcinom des Uterus aus 18 untersuchten, 4 Mammacarcinome aus 7 untersuchten, 3 Ovarialcarcinome von 4 un-

tersuchten und das einzige untersuchte Melanosarkom.
(Siehe auch Tabelle III.)
Bei 4 positiven Fällen, die wir nach quantitativen Methoden untersucht hatten, fanden wir einmal 5 Zellen in einem ccm Blut, einmal 4 Zellen im ccm, einmal 2 Zellen in einem ccm, einmal 1 Zelle neben 4 nicht sicher malignen Zellen in 2 ccm. Untersucht wurden jeweils 8 ccm Blut.
In 5 Fällen aus 44 untersuchten fanden wir Zellen, die nicht sicher als Geschwulstzellen zu identifizieren waren, aber auch nicht jüngere oder ältere normale Blutzellen darstellten, ebenso nicht Endothelien. Unter diesen 5 Proben ist besonders interessant das Blut einer Patientin, die an einem polymorphzelligen Sarkom des Uterus litt. Wir fanden darin zahlreiche Zellen von Monocytengröße mit stark hyperchromatischen, gelappten oder S-förmig gekrümmten Kernen, vereinzelt vakuolisiertem Zellplasma. Die Nukleolen waren nicht deutlich zu erkennen. Alle diese Fälle wurden als negativ bewertet.

Bei den 8 Kontrollversuchen mit Blut von nicht an bösartigen Geschwülsten leidenden Menschen fanden wir in keinem Fall Zellen, die als Geschwulstzellen hätten identifiziert werden können.
Interessant waren in einem Fall von chronischer Lymphadenitis zahlreiche Lymphocyten mit patologisch veränderten Kernen, die zum Teil stabförmig, gebogen oder eingeschnürt in Erscheinung traten.
I_m Blut einer Wöchnerin - 3 Tage post partum abgenommen - fanden sich sehr zahlreich außergewöhnlich stark

beladene Phagocyten, deren Kerne zum größten Teil im Untergang begriffen waren.

Diskussion der Ergebnisse im Hinblick auf das Vorkommen von Geschwulstzellen.

Mit 9 positiven Versuchen von 44 unternommenen entspricht unser Ergebnis etwa dem Durchschnitt der Funde anderer Autoren (siehe Tabelle IV), besonders, wenn man die Fortgeschrittenheit der Erkrankung bei der Mehrzahl unserer Patienten berücksichtigt.
Über 50 % positive Ergebnisse, wie in einer Arbeit von Moore und Mitarbeitern berichtet, lassen cytologische Fehlbeurteilung vermuten.
Wie viele Cubiccentimeter Blut bei der kleinen Zahl der darin sich befindenden Krebszellen abgenommen werden müssen, damit bei quantitativer Untersuchungsmethode mit Sicherheit über das Vorkommen oder Nichtvorkommen, eventuell sogar über die Häufigkeit entschieden werden kann, muß noch untersucht werden.
Dabei wäre zu beachten, ob eine Ausschwemmung in Schüben erfolgt, wie dies von manchen Autoren behauptet wird, und, wie weit diese Ausschwemmung von mechanischer Irritation des Tumors abhängig ist. (Untersuchung, Operation, Einbringung von Cytostaticis oder radioaktiven Isotopen in den Tumor.)

Daß bei direkter Abnahme aus Venen, die aus dem Tumor kommen, oder Abnahme mittels Herzkatheter von venösem Blut, das noch kein Capillarsystem passiert hat, mehr Zellen und etwas häufiger Zellen gefunden werden, steht außer Zweifel. Jedoch ist ersteres nur im Verlaufe einer Operation möglich, letzteres auch nur nach langen Vorbereitungen, bei denen der Erfolgszuwachs gegenüber einer peripheren Blutabnahme der Mühe nicht lohnt.
Während Engell und Sandberg und Mitarbeiter keinen operativen Anstieg nachweisen konnten, gelang dies Roberts und Mitarbeitern in 6 von 7 Fällen. Quellen der Fehlbeurteilung sind dabei wohl noch die lange Zeit zwischen den einzelnen Abnahmen und die kleine Zahl der untersuchten Fälle.
Daß bei direkter Verletzung kleine Gewebsstücke aus dem Tumor in die Blutbahn gelangen können, wurde von Ide, Harvey und Warren im Jahre 1939 durch ihre Versuche am gefensterten Kaninchenohr verdeutlicht. Dies dürfte besonders im Hinblick auf Probeexcisionen, Probepunktionen oder Cobaltspickungen interessant sein.
Bei der Operation eines malignen Tumors ließe sich die mögliche Ausschwemmung von Tumorzellen während der Präparation durch ein möglichst frühzeitiges Abklemmen der entsprechenden Venen und Unterlassen grober Palpation verringern. Die Untersuchungen von Whang als dem Jahre 1959 bestätigen die Verpflichtung hierzu in deutlicher Weise.
Der Fund von Carcinomzellen im Blut eines Patienten, der 2 Tage zuvor wegen eines Coloncarcinomes operiert worden

war, - berichtet von Pruitt und Mitarbeitern -, wirft die Frage nach der Lebensdauer und Länge der möglichen Umlaufzeit der Krebszelle auf. Es ist unklar, ob die Zelle von einem weiterwachsenden Tumorzellembolus aus einem anderen Organ stammt, oder noch aus der Zeit vor oder während der Operation im Blutstrom erhalten geblieben ist. Ersteres ist wahrscheinlicher. Eventuell könnten hierzu Tierversuche mit markierten Carcinomzellen erste Ergebnisse bringen. In jedem Falle schließt sich hier die Frage einer weiteren Therapie an.

Cruz, McDonald und Cole veröffentlichten im Jahre 1947 Untersuchungen über die Anwendung von cytostaticis ("Nitrogen mustard" und "Azaserine") an intravenös mit Carcinosarkom 256 infizierten Ratten, die teilweise gute Ergebnisse zeitigten.

Domagk verwandte bereits im Jahre 1959 die Zählung von Carcinomzellen im Blut von Ratten zur Austestung der Cytostatika "Bayer E 39" und"Bayer 3344".

Dies scheint uns auch für den Menschen ein wichtiges Gebiet der Anwendung einer quantitativen Methode der Geschwulstzellzählung werden zu können.

Wegen der geringen Zellfunde und ihrer oft schwierigen Deutung dürfte die Methode nur selten Ersthinweise gestatten oder ein Gradmesser für den Erfolg einer klassischen Therapie sein.

Bei Anwendung einer quantitativen Technik und sorgfältiger cytologischer Diagnostik aber kann die Methode der Geschwulstzellsuche im Blut wertvolle Hilfe für die klinische Beurteilung erbringen.

Erfahrungen mit den einzelnen Methoden.

Erfahrungen mit der Sedimentierungsmethode.

Die Methode nach Sandberg brachte uns in 16 Versuchen wenig Befriedigung. Die Absetzzeiten sind nicht immer so kurz, wie beschrieben. In vielen Modellversuchen fanden wir Geschwulstzellen auf dem Grund der abgesetzten Erythrocyten. Dagegen finden sich viele Erythrocyten im überstehenden Plasma, die sich bei der Auswertung störend bemerkbar machen.
Die Methode ist zwar wenig zeitraubend, aber auch gar wenig sicher. Die Reaktion der Geschwulstzelle beim einfachen Absedimentieren ist nicht nur vom spezifischen Gewicht, sondern auch von der Größe der Zelle und Umgebungsfaktoren abhängig (Stokessches Gesetz).
Zemansky berichtet im Jahre 1928, daß er Tumorzellen im fixierten, geschnittenen Sediment von Körperflüssigkeiten entweder in der Erythrocytenschicht, in der Schicht der Mesothelien, der der Leukocyten oder in allen Schichten finden konnte.
Wir selbst fanden bei einem Modellversuch, in dessen Verlauf wir Citratblut mit untergemischten Carcinomzellen in eine Bürette gefüllt 24 Stunden absetzen ließen, in allen Schichten des Erythrocytenkuchens Carcinomzellen.
Im Jahre 1949 veröffentlichten Li und Osgood eine Untersuchung über die Beschleunigung der Sedimentierungsgeschwindigkeit durch ein Phytohemagglutinin, das aus Phaseolus vulgaris gewonnen war. Die Zubereitung dieses

Extrakts ist schwierig. Die Ergebnisse sind schlechter als jene mit Fibrinogen erzielbaren.

Erfahrungen mit der Zellscheidungsmethode.

Die Methode zur Trennung von Leukocyten und Geschwulstzellen nach dem spezifischen Gewicht durch Zentrifugieren über einer Albuminlösung wurde von uns in 33 Versuchen erprobt. Die Bereitung der nötigen Lösungen ist langwierig, deren Aufbewahrung nur beschränkt möglich. Die Ausgangsstoffe sind teuer. Der Versuchsverlauf ist langwierig und relativ schwierig.
Da die Carcinomzellen in ihrem spezifischen Gewicht grosse Unterschiede aufweisen, ist das Ergebnis bei einer wirklich merkbaren Ausscheidung von Leukocyten ungenau, dies wird erst bei einer Albuminlösung mit einem spezifischen Gewicht von 1.070 und darunter erreicht.
(Siehe auch die Arbeit von McGrew aus dem Jahre 1954.)

Dagegen fanden wir bei einem Modellversuch einige Carcinomzellen unter einer Albuminlösung mit einem spezifischen Gewicht von 1.082. Bei einem Modellversuch mit gleichen Mengen gemischtem Blutes fanden wir in den Präparaten nach Saponinhämolyse 181 Zellen gegenüber 112 Zellen in Präparaten, die nach der Methode von Roberts gewonnen waren, bei Auszählung von je 10 etwa gleich dichten Gesichtsfeldern.
Die im Jahre 1948 von Spear angegebene Lösung (" gum acacia ")zur Trennung von Erythrocyten und Leukocyten scheint uns wegen der Schwierigkeit der Zubereitung keine Verbesserung der Methode zu ermöglichen.

Hingegen ist die von Seal im Jahre 1959 angewandte Silikonmischung mit einem spezifischen Gewicht von 1.075 leichter herzustellen und gut haltbar. Natürlich können die Ergebnisse nach Anwendung dieser Lösung auch nicht genauer sein, als Ergebnisse nach Verwendung einer genau eingestellten Albuminlösung.
Die vom gleichen Autor verwandten Stoffe: Polyvinylpyrrolidon zur Vermeidung von Ankleben der Blutzellen an die silikonisierte Gefäßwand und zum Schwebenderhalten von Blutplättchen und ähnlichen kleinen Partikeln, WR - 1339, - ein polymerer, oxyäthylierter, tertiärer Oktylphenolformaldehyd - , zur Vermeidung der bei uns in fast allen Fällen aufgetretenen, teilweisen Zusammenballung der Leukocyten, sollten noch erprobt werden.

Erfahrungen mit den Hämolysemethoden.

Bei 11 Versuchen, die Erythrocyten durch Essigsäure aufzulösen, fanden wir viele Hindernisse. Die zu zentrifugierende Flüssigkeitsmenge ist sehr groß. Das Sediment ist sehr dünnflüssig und hält schlecht auf dem Objektträger. Bei der Betrachtung der Präparate stört die große Menge Detritus. Für die Leukocyten ist die Essigsäure nicht sehr schonend.
Bei 2 orientierenden Versuchen nach der Methode von Szilárd fanden wir die Leukocyten gut erhalten, aber trotz steriler Reagentien und genauer Beachtung der Versuchsvorschrift in großen Mengen eines flockigen, rotbraunen Sedimentes einzeln verteilt.

Die von de Witt, del Vecchio, Borelli und Hilberg im Jahre 1957 zur Beseitigung von Erythrocyten und Fibrin angegebene Flüssigkeit (70 ccm 95 % Äthylalkohol + 25 ccm Chloroform + 5 ccm Eisessig) dürfte nur für Präparate von Ascitesflüssigkeit oder ähnlichem, sowie als Zusatzmethode in Frage kommen.

Bei 21 Versuchen, Blut mit 1 % Saponinlösung zu hämolysieren, stellten wir fest, daß die Zugabe der von Engell angegebenen Menge, nämlich des Blutvolumens, zum Untergang sämtlicher Zellen führte.

Wir gaben pro 8 ccm Blut im Durchschnitt 1.3 ccm 1 % Saponinlösung langsam zu und erhielten meist Präparate mit wenig Zellzerstörung, besonders, wenn wir die geringe Flüssigkeitsmenge (50 ccm) sofort abzentrifugierten, um längere Einwirkung zu vermeiden. Die von Butros in ihrer Wirkung untersuchte Konzentration von 5 mg/ccm wird bei weitem nicht erreicht.

Eine von uns ebenfalls nicht erreichte Konzentration von 0.2 % insgesamt soll nach Endres (1930) die Leitfähigkeit einer Suspension von weißen Blutkörperchen des Pferdes nicht verändert haben.

Bei vorsichtiger, über einige Minuten verteilter Zugabe der 1 % Saponinlösung halten wir diese Methode der Hämolyse für sehr schätzenswert.

Die von Engell praktizierte Härtung und " histologische " Aufarbeitung des Sedimentes halten wir in Anbetracht der damit verbundenen häufigen Zellverletzung und des Zeitverlustes für unzweckmäßig.

Eine weitere Methode zur Auflösung der Erythrocyten wurde von Singer, Silberbach und Schwartz im Jahre 1947 beschrieben. Sie gebrauchten eine Mischung von Lysolecithin und Gramicidin. Die Herstellung der Lysolecithinlösung ist so umständlich, daß die Methode für die Praxis wohl kaum interessant sein dürfte.
Malmgren, Pruitt, del Vecchio und Potter endlich verwandten nach ihrer Veröffentlichung aus dem Jahre 1958 Streptolysin-O zur Auflösung der Erythrocyten und teilweisen Auflösung der Granulocyten. Die Methode ist einfach in der Anwendung und scheint Geschwulstzellen morphologisch und biochemisch nicht zu schädigen. Sie ist somit der Hämolyse-Methode mittels Saponin sehr ähnlich. Die bessere Methode müßte durch einen direkten Vergleich ermittelt werden.

Erfahrungen mit dem Hilfsmittel der Filtration.

Die Filtration der zu untersuchenden Flüssigkeit durch plane Filter scheint uns eine wertvolle Hilfe bei der Untersuchung des Blutes nach Krebszellen zu sein.
Wir konnten uns bei 9 Fällen davon überzeugen.

Die Filtration bei ganz geringem Unterdruck durch Cellafilter " grob " mit einer Porenweite von unter 1/u dauert nur sehr kurze Zeit. In orientierenden Versuchen fanden wir, daß die Filter mit einem Porendurchmesser unter 1/u geeigneter sind, als die von Pruitt und Mitarbeitern im Jahre 1958 und von Seal im Jahre 1959 gebrauchten Filter mit einer Porenweite

von 5/u, weil die Zellen auf dem kleinerporigen Filter in einer Ebene liegen und leichter zu betrachten sind. Am Rande der Zellschicht auf dem Filter sahen wir häufig zerstörte Zellen. Wir nehmen an, daß diese Zerstörung durch die nicht glatte Fläche des Filtriergeräteaufsatzes verursacht wurde.
Wir glauben, daß im Gegensatz zum Vorgehen von Seal im Jahre 1959 eine Fixierung der Zellen erst nach der Filtration vorgenommen werden sollte, damit durch den festeren Kontakt zwischen Zellen und Filtern ein Verlust von Zellen während der Färbung verhindert werden kann.

Vergleich der Methoden im Hinblick auf die Brauchbarkeit.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die einfachste und billigste Methode zur Untersuchung von Blut auf Geschwulstzellen in der Hämolyse durch 1 % oder 0.5 % Saponinlösung (- eventuell auch durch Streptolysin-O -) und nachfolgender Filtration durch plane Filter, sowie Fixierung und Färbung auf dem Filter zu suchen ist. Bei sorgfältiger Versuchsführung kann diese Methode quantitativ genannt werden.
Zur Gerinnungsverhinderung ist Natriumcitratlösung am besten geeignet. Sie ist billig, in normalen Dosen unschädlich, leicht von jedem zu handhaben. Lange Aufbewahrungszeiten sind am besten zu vermeiden. Die Zugabe von Saponin erfolge vorsichtig und sparsam; - nicht vollständige Hämolyse ist am zweckmäßigsten. Die Zentrifugierung sei nicht härter als 1000 Umdrehungen über

10 Minuten.
Niedriger Unterdruck (- unter 20 mm Hg -) bei der Filtration wird die Zellen nicht schädigen. Die Fixierung des Präparates geschehe vorsichtig um Zellverluste zu vermeiden.

Färbung nach Papanicolaou gibt klare Zelleinzelheiten. Verlängerte Wässerungszeit nach der Hämatoxylineinwirkung und eingehende Dehydratation lassen den Filtergrund homogen und zartrosa erscheinen. Luftblasenfreies Eindecken unter reichlicher Zugabe des Eindeckmittels kann die Präparate lange Zeit erhalten.
Die Vormusterung der Präparate ist etwas langwierig (1 - 2 Stunden pro Filter), kann aber von einer technischen Assistentin besorgt werden, die in der normalen Blutmorphologie bewandert ist und über allgemeincytologische Grundkenntnisse verfügt. Sie merkt für den endgültigen Betrachter alle nicht einordenbare Zellen auf dem Deckglas an.
Um die Methode zu erlernen und zu kontrollieren, ist es zweckmäßig, Modellversuche mit ins Blut gemischten Geschwulstzellen zu unternehmen.

IV. ZUSAMMENFASSUNG.

Nach einem Bericht über die bisher erschienenen Arbeiten aus dem Themenkreis und einigen Anmerkungen über die pathologischen und pathophysiologischen Voraussetzungen des Findens von Tumorzellen im Blut werden in 88 Versuchen, - davon 32 Modellversuche mit eingebrachten Carcinomzellen - , die Methode der Sedimentierungsbeschleunigung der Erythrocyten durch Fibrinogenlösung, die Methode der Zellscheidung durch Zentrifugieren über einer Albuminlösung, die Auflösung der Erythrocyten durch Essigsäure, die Auflösung der Erythrocyten durch Saponinlösung, die Filtration eines auf diese Weise hämolysierten Blutes durch plane Filter erprobt und die morphologischen und chemischen Identifikationsmöglichkeiten erörtert.

Es wird berichtet, daß im Blut von 44 Patienten mit meist fortgeschrittenen Tumoren in 9 Fällen Geschwulstzellen gefunden werden konnten.

Anhand der gewonnenen Erfahrungen wird versucht, die einfachste, billigste und zuverlässigste Methode zur Erfassung von Geschwulstzellen im Blut zu ermitteln.

V. TABELLEN UND AUFNAHMEN.

TABELLE I

	Autoren	Zelle allgemein: Zellgrößenzunahme	Zelle allgemein: Zellgrenzen	Plasma: Form und Farbe	Plasma: Granulierung	Plasma: Vakuolisierung	Kern: Kernplasmarelat.-Verschiebung	Kern: Größenzunahme	Kern: Zahlenmäß.Zunahme	Kern: Form und Farbe	Kern: Chromatingerüst	Kern: Membran	Kern: Mitosen	Nukleus-Nukleolus-Relationserhöhung	Kernkörperchen: Zahlenmäßige Zunahme	Kernkörperchen: Größenzunahme
Sekrete	Papanicolaou	+	ev. /	unregelm.,oxyphil, basophil		(+)	+			Polymorphie Hyperchrom.	ev.Vak. unregelm.	ev. (+) betont			+	+
	Smolka- Soost	(+)		Hyper-und Hypo-chromasie			+	(+)	(+)	Polymorphie Hyper-+Hypochr. Anisonukleose	grob	ev. (+) betont		+		
Blut	Ehrlich	+	unscharf	basophil + oxyphil	(+)			+		Ovoid,rund, bohnenförmig						
	Israel u. Leyden							+		bläschenfg.						
	Schleip	+								zerfließlich						
	Ward	+								Polymorphie	Netz					
	Marcus					+					unregelm. (/)					
	Quensel	+								dunkel						
	Pool u. Dunlop	+		rund						Polymorphie unregelm.						
	Engell								(+)	dunkel				+	+	+
	Sandberg u.Moore	+		schaumig,oxyphil basophil				+							+	+
	Pruitt	+		oxyphil u.basophil				+		dkl.,grob				+		
	Undritz		unscharf	s.variabel,oxyphil+ basophil+polychrom.	(+)			+		dunkel						+
	Eigene Ergebnisse	+	unscharf	basophil			+	+		Polymorphie unregelm. Hyper-+Hypo-Chromasie				+		+

TABELLE II

Der Größe nach mit Geschwulstzellen leicht zu verwechselnde Blutzellen. - Charakteristika.

Zellart	Zellgröße	Kern	Plasma
Makronormoblast	18-22 µ	Ev. Blaue Vakuolen grobes Chromatin.	
Promegaloblast	18-25 µ	Feines radiär.Chromatin, oft Nukleolen.	Tiefblau.
Megaloblast (basophil)	16-20 µ	s.o.,Chromatin grober.	
Monoblast	16-22 µ	Wenig feines Chromatin; Kern rund;ev.eingeb; 2-6 Nukleolen.	Trübes Blau ohne Granula.
Promonocyt	16-22 µ	s.o.;aber meist eingeb. Keine Nukleolen.	Blaßblau, beg.Granula.
Monocyt	16-20 µ	Kern eingeb.,wenig lockeres Chromatin.	Taubenblau Azur-Granula-wolken.
Lymphoblast	12-14 µ	Grobes Chromatin; meist 1 Nukleolus.	Dunkelblau keine Granula.
Prolymphocyt		s.o.; Nukleolen undeutlich.	
Proplasmocyt	-25 µ	Chromatinnetz verschwommen; 3-6 Nukleolen.	Sattblau(ev.rot), ev.Vakuolen, ev.Kernhof.
Plasmocyt	12-14 µ	Chromatin radiär,sehr dicht und grob. Keine Nukleolen.	Sattblau, ev. Kernhof.
Megakaryoblast	ca.20 µ	Haploid-oktoploid. Nicht sehr reichl. Chromatin.	Blau. Keine Granula.
Promegakaryocyt		-16-ploid; Kern eingebuchtet.	Eher polychromatisch.
Megakaryocyt	-100 µ	"Hirschgeweihkern"; viele blaue Nukleolen.	Rosa mit feinen Azurgranula.

TABELLE III

Armvenenblut

Diagnose	Zahl der untersuchten Fälle	Zahl der positiven Ergebnisse
Collumcarcinom	18	1
Mammacarcinom	8	4
Corpuscarcinom	4	0
Ovarialcarcinom	4	3
Vaginalcarcinom	2	0
Hypernephrom	2	0
Bronchialcarcinom	2	0
Prostatacarcinom	1	0
Larynxcarcinom	1	0
Uterussarkom	1	0
Melanosarkom	1	1
	44	9

TABELLE IV

Autor	Jahr	Vitalblut	Hilfsstoffe	Methode: Sed.-Histol.	Sed.-Smear	Sed.-Filter	D.Tropfen	Operable Fälle: Regionales Gefäß Vor Op. Fälle	Vor Op. positiv	Nach Op. Fälle	Nach Op. positiv	Periph.Gef. Vor Op. Fälle	Vor Op. positiv	Gesamt Fälle	Gesamt positiv	%	Inoperable Fälle: Reg.Gef. Fälle	Reg.Gef. positiv	Periph.Gef. Fälle	Periph.Gef. positiv	%	Op. + Inop. Reg. Gef. Fälle	Reg. Gef. positiv	%	Op. + Inop. Periph.Gef. Fälle	Periph.Gef. positiv	%	Gesamtergebnisse. Fälle	positiv	%	at. Zellen	%
Quensel	21		H_2O		+														50	6								50	6			
Pool und Dunlop	34	+	Essigsäure	+													1	-	39	17								40	17			
Undritz	52						+																									
Engell	55	+	Saponin	+				75	29	102	44	79	6	126	70	55.5			14	3		102	44	43.1	93	9		140	64	45.0	27	19.2
Fisher u.Turnbull	55			+																												
Sandberg u.Mitarb.	57	+	Fibrinogen		+														105	45	42.8	55	22		132	55	41.5(	187	77	41.1	)+)	
Moore u. Mitarb.	57	+	Fibrinogen		+																	109	60	55	179	93	51.9(	288	153	53.1	)+)	
Roberts u.Mitarb.	58	+	Fbg.+Albumin		+									72	12		4	2	26	8		31	9		92	15		100	21	21		
Sandberg u.Mitarb.	58	+	Fibrinogen		+																							305	27	8.8	26	8.5
Pruitt u. Mitarb.	58	+	Streptolysin-O			+																						100	39	39	12	12
Whang	58	+	Saponin		+									12	1		4	-	29	-		8			37	-		45	1			
Eigene Ergebnisse	59	+	verschiedene		+	+													44	9					44	9		44	9			
																												824	184	22.3		

+) In der Gesamtsumme nicht berücksichtigt.

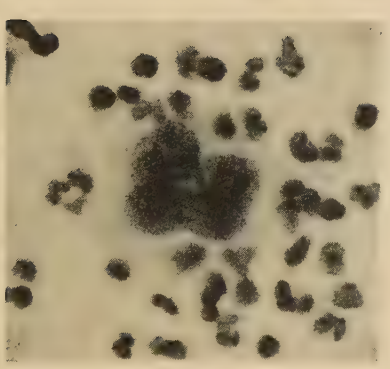

Abbildung 1

Objektiv Plan 40, Blende 5,
Belichtungszeit 3 Sekunden.

Große, vierkernige Zelle aus dem Blut einer Patientin, welche an einem Ovarialcarcinom mit Lungenmetastasen litt. (S. O., Nr. 83) Die außergewöhnlich plasmareiche Zelle ist von Leukocyten umgeben. Das Kernkörperchen im linken, unteren Kern ist in typischer Weise vergrößert. Methode: Filtration.

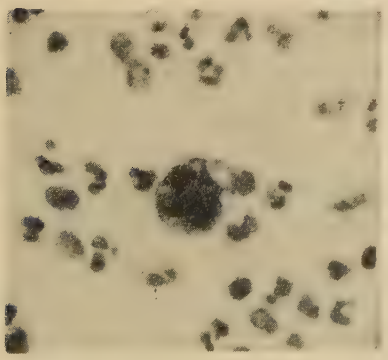

Abbildung 2

Objektiv Plan 40, Blende 5,5
Belichtungszeit 4 Sekunden.

Zellklumpen aus dem peripheren Blut einer Patientin, die wegen eines Rezidives eines Ovarialcarcinoms mit Knochenmetastasen in Behandlung war. (H. R., Nr. 82)
Das Blut wurde mittels Saponin hämolysiert und filtriert.

Abbildung 3

Objektiv Plan 40, Blende 3, Belichtungszeit 2.5 Sekunden.

Großer, nackter Kern aus dem Blut einer Patientin, die wegen eines Mammacarcinomes mit Fernmetastasen bestrahlt wurde. In der Mitte des Kernes ist ein vakuolenartiger Defekt zu erkennen, neben ihm beschädigte Leukocyten. Präparation: Hämolyse durch Saponin. (Patientin M. M. Nr. 78)

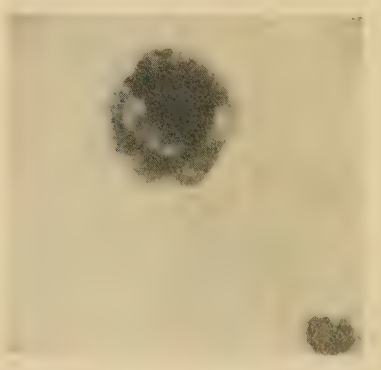

Abbildung 4

Objektiv Plan 100 Öl, Blende 4, 4 Sekunden.

Zelle aus dem Armvenenblut einer an einem Melanosarkom mit Fernmetastasen leidenden Patientin. (G. H., Nr. 79) Neben der großen Zelle Erythrocyten und Detritus. Methode: Hämolyse mittels Saponin.

Die Aufnahmen erfolgten auf Schwarz-Weiß-Film KB 14.

VI. LITERATURVERZEICHNIS.

1. Agranoff, B.W., Vallee, B.L. und Waugh, D.F. : Centrifugal Subfractionation of Polymorphonuclear Leukocytes, Lymphocytes and Erythrocytes.
Blood 9 : 804, 1954.

2. Allgöwer, M. : Über die Wirkung von Heparin, polyanetholsulfosaurem Natrium (Liquoid Roche) und tribasischem Natriumcitrat auf menschliche Leukocyten in vitro.
Schweiz. Med. Wschr. 77 : 40, 1947.

3. Ambrus, J.L., Ambrus, C.M., Byron, J.W., Goldberg, M.E. und Harrisson, J.W.E. : Study of Metastasis with Labeled Ascites Tumor Cells.
Ann.N.J. Acad. Sc. 63 : 938, 1956.

4. Aschoff, L. : Ein Fall von Myelom.
Münch. Med. Wschr. 53: 337 , 1906.

5. Ashworth, T.R. : A Case of Cancer in Which Cells Similiar to Those in the Tumours Were Seen in the Blood After Death.
Austral. Med. J. 14 : 146, 1869 cit. nach Roberts u. Mitarb.

6. Baserga, R. und Saffiotti, U. : Experimental Studies on Histogenesis of Blood - borne Metastases.
A.M.A. Arch. Path. 59 : 26, 1955.

7. Biermann, H.R., Byron, R.L. Kelly, K.H. und Cordes, F. : The Behavior of Leukemic Cells during Continuous Cross-Transfusions between Patients with Leukemic and other

Neoplastic Diseases.
Cancer Res. 11 : 236, 1951.

8. Blumenthal, F. : Über Erzeugung von Tumoren mit Blut von Tumortieren.
Zschr. Krebsforsch. 29 : 549, 1929.

9. Brown, C.E. und Warren, S. : Visceral Metastasis from Rectal Cancer.
Surg. Gyn. Obstetr. 66 : 611, 1938.

10. Buckley, E.S. Jr., Powell, M.J. und Gibson, J.G. II. : The Separation of the Formed Elements of whole Blood by Means of Fraction I.
J, Laborat. Clin. Med. 36 : 29, 1950.

11. Butros, J. The Effect of Saponin on Tissue and Cancer Cells in vitro.
Cancer Res. 8 : 221, 1948.

12. Coman, D.R., de Long, R.P. und McCutcheon, M. : Studies on the Mechanisms of Metastasis. The Distribution of Tumors in Varions Organs in Relation to the Distribution of Arterial Emboli.
Cancer Res. 11 : 648, 1951.

13. Coman, D.R. und de Long, R.P. : The Rôle of the Vertebral Venous System in the Metastasis of Cancer to the Spinal Column.
Cancer 4 : 610, 1951.

14. Coman, D.R. : Mechanisms Responsible for the Origin and Distribution of Blood - borne Metastases.
Cancer Res. 13 : 397, 1953.

15. Cruz, E.P., McDonald, G.O. und Cole, W.H. Prophylactic Treatment of Cancer.
Surgery 40 : 291, 1956.

16. Domagk, G. : Experimentelle Grundlagen chemotherapeutischer Rezidivprophylaxen.
Vortrag auf der 7. Österreichischen Krebstagung zu Salzburg am 14. und 15. Mai 1959. Sonderdruck der Bayer A.G.

17. Ebner, H. : Zytotopochemie. (Vortrag) In : Gynäkologische Zytologie. Herausgegeben von Runge, H. im Jahre 1954.

18. Ehrlich, P. : Beobachtungen über einen Fall von perniciöser, progressiver Anämie mit Sarkombildung.
Charité - Ann. 5 : 198, 1880.

19. Endres, G. : Beobachtungen, betreffend die elektrische Leitfähigkeit der weißen Blutkörper.
Zschr. Biol. 90 : 63, 1930.

20. Engell, H.C. : Cancer Cells in the Circulating Blood.
Acta Chir. Scand. suppl. 201, 1955.

21. Fåhraeus, R. : The Suspensionstability of the Blood.
Acta. Med. Scand 55 : 1, 1921.

22. Fawcett, D.W., Vallee, B.L. und Soule, M.H. : A Method for Concentration and Segregation of Malignant Cells from Bloody, Pleural, and Peritoneal Fluids.
Science 111 : 34, 1950.

23. Fisher, E.R. und Turnbull, R.B. Jr. : The Cytologic Demonstration and Significance of Tumor Cells in the Mesenteric Venous Blood.
Surg. Gyn. Obstetr. 100 : 102, 1955.

24. Fränkel, E. : Versuche zur zellfreien Übertragung von Säugetiertumoren.
Zschr. Krebsforsch. 33 : 454, 1931.

25. Goldmann, E.E. : Anatomische Untersuchungen über die Verbreitungswege bösartiger Geschwülste.
Beitr. Klin. Chir. 18 : 595, 1897.

26. Gomori, G. microscopic Histochemistry. 1952.

27. Gormsen, H. : Knoglemarvsundersøgelser.
Diss. 1942. Kopenhagen.

28. Graham, G.S. : The Cancer Cells of Serous Effusions.
Amer. J. Path. 9 : 701, 1933.

29. Grawitz, P. : Maligne Osteomyelitis und sarcomatöse Erkrankungen des Knochensystemes als Befunde bei Fällen von perniciöser Anämie.
Virchows Arch. Path. Anat. 76 : 353, 1879.

30. Gray, S.J. und Mitchell, E.B. : Effect of Purified Protein Fractions on Sedimentation Rate of Erythrocytes.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 51 : 403, 1942.

31. Haumeder, E. : Vergleichende Kern - und Nukleolenmessungen an verschiedenen Organgeweben mit besonderer Berücksichtigung der malignen Tumorzellen.
Zschr. Krebsforsch. 40 : 105, 1933.

32. Ide, A.G., Harvey, R.A. und Warren, S.L. : Rôle Played by Trauma in the Dissenimation of Tumor Fragments by the Circulation.
Arch. Path. 28 : 851, 1939.

33. Israel, O. und Leyden : Referat, gehalten während der Sitzung der Berliner Medizinischen Gesellschaft am 19.2. 1890.
Berliner Klin. Wschr. S. 231, 1890.

34. Iwasaki, T. : Histological and Experimental Observations on the Destruction of Tumour Cells in the Blood Vessels.
J, Path. Bact. 20 : 85, 1915.

35. Jeannée, H. : Zur Frage der Metastasenbildung bei Einbrüchen von Carcinomen in den großen Kreislauf.
Virchows Arch. Path. Anat. 256 : 684, 1925.

36. Johnson, A.J. : Cytological Studies in Association with Local Injections of Streptokinase - Streptodornase into Patients.
J. Clin. Invest. 29 : 1376, 1950.

37. Juniper, K.Jr. und Chester, C.L. : A Filter Membrane Technique for Cytologial Study of Exfoliated Cells in Body Fluids.
Cancer 12 : 278, 1959.

38. Li, J.G. und Osgood, E.E. : A Method for the Rapid Separation of Leukocytes and Nucleated Erythrocytes from Blood or Marrow with a Phytohemagglutinin from Red Beans (Phaseolus vulgaris).
Blood 4 : 670, 1949.

39. Lipschütz, B. : Über Erzeugung von Tumoren mit Blut von Tumortieren.
Wien. Klin. Wschr. 42 : 1593, 1929.

40. de Long, R.P., Coman, D.R. und Zeidman, I. : The Significance of Low Calcium and High Potassium Content in Neoplastic Tissues.
Cancer 3 : 718, 1950.

41. Lucké, B., Breedis, C., Woo, Z.P., Berwick, L. und Nowell, P. : Differential Growth of Metastatic Tumors in Liver and Lung. (Experiments with Rabbit V_2 Carcinoma.)
Cancer Res. 12 : 734, 1952.

42. MacCarty, W.C. : Notes on the Regularity and Similarity of Cancer Cells.
Collected Papers Mayo Clinic 6 : 600, 1914.

43. MacCarty, W.C. und Haumeder, E. : Has the Cancer Cell Any Differential Characteristics?
Amer. J. Cancer 20 : 403, 1934.

44. MacCarty, W.C. : Identification of the Cancer Cell.
J. Amer. Med. Ass. 107 : 844, 1936.

45. Malmgren, R.A., Pruitt, J.C. del Vecchio, P.R. und Potter, J.F. : A Method for the Cytologie Detection of Tumor Cells in Whole Blood.
J. Nat. Cancer Inst. 20 : 1203, 1958.

46. Mandlebaum, F.S. : The Diagnosis of Malignant Tumors by Paraffin Sections of Centrifuged Exudates.
J. Lab. Clin. Med. 2 : 580, 1917.

47. Marcus, H. : Krebszellen im strömenden Blut?
Zschr. Krebsforsch. 16 : 217, 1917.

48. Mauclaire, M.-P. : Transfusion sanguine faite par mégarde

avec du sang provenant d´une cancereuse.
Bull. Ass. Franç. Cancer 18 : 626, 1929.

49. McGrew, E.A. : Concentration of Cells from Body Fluids for Cytologic Study.
Amer. J. Clin. Path. 24 : 1025, 1954.

50. Minor, A.H. und Burnett, M.S. : A Method for Obtaining Living Leukocytes from Human Peripheral Blood by Acceleration of Erythrocyte Sedimentation.
Blood 3 : 799, 1948.

51. Mitus, W.J., Bergna, L.J., Mednicoff, I.B. und Dameshek, W .: Cytochemical Studies of Glycogen Content of Lymphocytes in Lymphocytic Proliferations.
Blood Vol. 13; No. 8, 1958.

52. Moore, G.E., Sandberg, A.A. und Schubarg, J.R. : Clinical and Experimental Observations of the Occurrence and Fate of Tumor Cells in the Blood Stream.
Ann. Surg. 146 : 580, 1957.

53. Naidu, V.R. : The Value of Enlarged Nucleoli in Diagnosis of Malignancy.
Proc. Staff Meet. Mayo Clin. 10 : 356, 1935.

54. Ostenfeld, J. : Om Svulstcellers Spredning i Organismen.
(Eksperimentelle Undersøgelser paa Mus.)
Diss. 1941 Kopenhagen.

55. Papanicolaou, G.N. : Atlas of the Exfoliative Cytology.
1954.

56. Pool, E.H. und Dunlop, G.R. : Cancer Cells in the Blood Stream.
Amer. J. Cancer 21 : 99, 1934.

57. Prinzmetal, M. Ornitz, E.M. Jr., Simkin, B. und Bergman, H.C. : Arterio- Venous Anastomoses in Liver, Spleen and Lungs.
Amer. J. Physiol. 152 : 48, 1948.

58. Pruitt, J.C. Hilberg, A.W. und Kaiser, R.F. : Malignant Cells in Peripheral Blood.
N. England J. Med. 259 : 1161, 1958.

59. Quensel, U. : Zur Kenntnis des Vorkommens von Geschwulstzellen im zirkulierenden Blute.
Upsala Läk. Fören Förh. 26 : 1, 1921.

60. Roberts, S., Watne, A., McGrath, R., McGrew, E. und Cole, W.H.: Technique and Results of Isolation of Cancer Cells from the Circulating Blood.
A.M.A. Arch. Surg. 76 : 334, 1958.

61. Roskin, G.I. und Struve, M.E. : Differential Cytophysiological Diagnosis of Cancerous and Normal Tissues.
Stain Technol. 22 : 83, 1947.

62. Sandberg, A.A. und Moore, G.E. : Examination of Blood for Tumor Cells.
J. Nat. Cancer Inst. 19 : 1, 1957.

63. Sandberg, A.A., Moore, G.E. Crosswhite, L.H. und Schubarg, J.R. : The Frequency of Tumor Cells in the Borne Marrow and Blood.
Cancer 11 : 1180, 1958.

64. Sandberg, A.A., Moore, G.E. und Schubarg, J.R. " Atypical " Cells in the Blood of Cancer Patients - Differentiation

from Tumor Cells.
J. Nat. Cancer Inst. 22 : 555, 1959.

65. Schleip, K. : Zur Diagnose von Knochenmarkstumoren aus dem Blutbefund.
Zschr. Klin. Med. 59 : 261, 1906.

66. Schmidt, M.B. : Die Verbreitungswege bösartiger Karzinome und die Beziehung generalisierter Sarkome zu den leukämischen Neubildungen. Jena, 1903.

67. Seal, S.H. : A Method for Concentrating Cancer Cells Suspended in Large Quantities of Fluid.
Cancer 9 : 866, 1956.

68. Seal, S.H. Silicone Flotation : A Simple Quantitative Method for the Isolation of Free-floating Cancer Cells from the Blood.
Cancer 12 : 590, 1959.

69. Singer, T.P., Silberbach, I. und Schwartz, S. : The Preparation of Morphologically Intact Leukocytes from Peripheral Blood by Means of Gramicidin and Lysolecithin.
Blood Spec. Issue No. 1 , 1947.

70. Smolka, H. und Soost, H.J. : Grundriß und Atlas der gynäkologischen Cytodiagnostik. 1956.

71. Spear, F. : Separation of Leukocytes from Whole Blood by Flotation on Gum acacia.
Blood 3 : 1055, 1948.

72. Spiegel, M. : The Reaggregation of Dissociated Sponge Cells.
Ann.N.J.Acad. Sc. 60 : 1057, 1955.

73. Szilárd, P.: Eine Methode zur isolierten Gewinnung der weißen Blutkörperchen.
Arch. Physiol. 211 : 597, 1926.

74. Thiersch, C.: Der Epithelialkrebs, namentlich der Haut.
Leipzig, 1865.

75. Undritz, E.: Sandoz - Atlas der Hämatologie. 1952.

76. Vellee, B.L., Hughes, W.L.Jr. und Gibson, J.G. II.:
A Method for the Separation of Leukocytes from Whole Blood by Flotation on Serum Albumin.
Blood Spec. Issne No. 1; S. 82, 1947.

77. del Vecchio, P.R., Siegler, E.E. und Hilberg, A.W.:
A New, Inexpensive Circling Device for Marking Specific Areas on Tissue Smears or Sections.
J. Nat. Cancer Inst. 16 : 985, 1956.

78. Virchow, R. : Ueber bewegliche thierische Zellen.
Virchows Arch. Path. Anat. 28 : 237, 1863.

79. Ward, G.R.: Blood in Cancer with Bone Metastases.
Lancet 1 : 676, 1913.

80. Warren, S. und Gates, O.: The Fate of Intravenously Injected Tumor Cells.
Amer. J. Cancer 27 : 485, 1936.

81. Weiss, P.: Perspectives in the Field of Morphogenesis.
Quart. Rev. Biol. 25 : 177, 1950

82. Whang, J.: Über Krebszellen in Blut und Knochenmark.
Zschr. Krebsforsch. 62 : 397, 1958.

83. Willis, R.A.: Pathology of Tumours.
St. Louis, 1948.

84. de Witt, S.H., del Vecchio, P.R., Borelli, J.I. und Hilberg, A.W.: A Method for Preparing Wound Washings and Blood Fluids for Cytologic Evaluation.
J. Nat. Cancer Inst. 19 : 115, 1957.

85. Zadek, I.: Die cytodiagnostischen Kennzeichen der Krebszellen.
Acta Med. Scand. 80 : 78, 1933.

86. Zeidman, I., McCutcheon, M. und Coman, D.R.: Factors Affecting the Number of Tumor Metastases. Experiments with a Transplantable Mouse Tumor.
Cancer Res. 10 : 357, 1950.

87. Zeidman, I. und Buss, J.M.: Transpulmonary Passage of Tumor Cell Emboli.
Cancer Res. 12 : 731, 1952.

88. Zemansky, A.Ph. Jr. The Examination of Fluids for Tumor Cells.
Amer.J.Med. Sc. 175 : 489, 1928.

ANHANG: LEBENSLAUF

Mad, Helmut wurde am 24.2.1936 in Nürnberg geboren. Er besuchte die Volksschule in Nürnberg, Bruck /Leitha (Österreich) und Betzenstein (Oberfranken). Von 1946 bis 1954 Aufenthalt in einem Schülerheim zum Besuch des Humanistischen Gymnasiums Windsbach/Mfr. Im Jahre 1954 legte er dort die Reifeprüfung ab und immatrikulierte sich an der Universität Erlangen zum Studium der Medizin. In den Semesterferien Arbeit als Krankenpfleger oder Helfer in Bau- und Metallindustrie. Vom 2. bis zum 5. Fachsemester Mitarbeiter der Studiobühne der Universität Erlangen.
Nach der im Frühjahr 1957 bestandenen ärztlichen Vorprüfung immatrikulierte er sich an der Universität München. Im Sommer 1957 arbeitet er in der Bauindustrie, im Jahre 1958 famulierte er im März in einer medizinischen, im April in einer chirurgeschen Klinik, im August in einer Frauenklinik, im September in einer Kinderklinik, im Oktober in einer Nervenklinik. Im Jahre 1959 arbeitete er an einer Dissertation im Cytologischen Laboratorium der I. Universitätsfrauenklinik München. Seit der im Juni 1960 bestandenen ärztlichen Prüfung Arbeit als Medizinalassistent am Kreiskrankenhaus Waldkirchen.

Waldkirchen, den 30.6.60 Helmut Mad